

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA CARVALHO

Glicosilação regiosseletiva da hesperetina catalisada por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, em biorreator.

> Goiânia 2019

SEI/UFG - 1585759 - Termo de Ciência e de Autorização (TECA)



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

[X] Dissertação [] Tese

2. Nome completo do autor

Pedro Henrique de Oliveira Carvalho

3. Título do trabalho

Glicosilação regiosseletiva da hesperetina catalisada por Cunninghamella echinulata ATCC 9244, em biorreator

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [] NÃO'

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas

mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

 Served:
 Documento assinado eletronicamente por Valéria de Oliveira, Usuário Externo, em 30/09/2020, às 11:22, conforme horário oficial de Brasilia, com

 Served:
 Documento assinado eletronicamente por Valéria de Oliveira, Usuário Externo, em 30/09/2020, às 11:22, conforme horário oficial de Brasilia, com

 Served:
 Documento assinado eletronicamente por Eric De Souza Gil, Coordenador de Pós-graduação, em 30/09/2020, às 12:34, conforme horário oficial de Brasilia, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

 Served:
 Documento assinado eletronicamente por PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA CARVALHO, Discente, em 01/10/2020, às 10:14, conforme horário oficial de Brasilia, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

 Served:
 Documento assinado eletronicamente por PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA CARVALHO, Discente, em 01/10/2020, às 10:14, conforme horário oficial de Brasilia, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

 Served:
 Documento assinado eletronicamente por PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA CARVALHO, Discente, em 01/10/2020, às 10:14, conforme horário oficial de Brasilia, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.

 Served:
 A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <u>https://sei.ufg.br/sei/controlador.externo.php2</u>

 Acace=documento conferir&id orgao acesso externo=0, informando o código verificador 1585759 e o código CRC EDDCE08A.

Referência: Processo nº 23070.044010/2020-81

SEI nº 1585759

Glicosilação regiosseletiva da hesperetina catalisada por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, em biorreator.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador (a): Professora. Dr.ª. Valéria de Oliveira

Goiânia 2019 Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

CARVALHO, PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA Glicosilação regiosseletiva da hesperetina catalisada por Cunninghamella echinulata ATCC 9244, em biorreator. [manuscrito] / PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA CARVALHO. - 2019. 81 f.: il. Orientador: Prof. Dr. Valéria de Oliveira. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2019. Bibliografia. Anexos. Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas. 1. Biotransformação. 2. Hesperetina 7-O-?-D-glicopiranosídeo. 3. Citotoxicidade. I. Oliveira, Valéria de, orient. II. Título. CDU 615.1





Ministério da Educação Universidade Federal de Goiás Faculdade de Farmácia Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



ATA DE SEÇÃO DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE Pedro Henrique de Oliveira Carvalho. Na data de 29 de março de 2019, às 08:00 horas, na sala de aula do Programa/Anexo II da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os membros da Banca Examinadora: Profa. Dra. Valéria de Oliveira (FF/UFG), Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara (FF/UFG), Profa. Dra. Evilanna Lima Arruda (UNIRV), e Profa. Dra. Mariângela Fontes Santiago (FF/UFG) como suplente. Sob a Presidência da Orientadora, em sessão pública, procedeu-se à avaliação da defesa da Dissertação intitulada: "Glicosilação regiosseletiva da hesperetina catalisada por Cunninghamella echinulata ATCC 9244, em biorreator", de autoria de Pedro Henrique de Oliveira Carvalho, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFG, no nível de Mestrado. A sessão foi aberta pela presidente da Banca, Profa. Dra. Valéria de Oliveira, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao pós-graduando que, em 40 minutos, apresentou o seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Mestrando, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Ao final, a banca reunida em separado procedeu à avaliação do trabalho. A Dissertação foi considerada aprovada _ pela Banca Examinadora, completando integralmente este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás, em conformidade com o estabelecido pela Resolução nº 1477/2017, do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura da UFG (CEPEC/UFG), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFG. Para fins de publicação eletrônica, ao pós-graduando poderá efetuar as modificações eventualmente sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar à Secretaria do PPGCF, respeitando-se o prazo máximo de 30 dias após a data da Defesa. A conclusão do curso e a emissão do diploma dar-se-ão em conformidade com o estabelecido pela Resolução CEPEC nº 1477/2017. Cumpridas as formalidades de pauta, às <u>9</u> horas e <u>55</u> minutos, a presidência da banca encerrou esta sessão de defesa de Dissertação e, para constar eu, Fernanda Maura Ferreira Bellato, Secretária do PPGCF/UFG, lavrei a presente Ata que, depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, em duas vias de igual teor.

Membro	Aprovado /Reprovado	Assinatura
Profa. Dra. Valéria de Oliveira (FF/UFG) - Presidente	Aprovado	2) aléria de Oliveir
Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara (FF/UFG)	Aprovado	MM
Profa. Dra. Evilanna Lima Arruda (UNIRV)	Anrouado	Evilonna la Anuda
Profa. Dra. Mariângela Fontes Santiago (FF/UFG) - Suplente		
Parecer Final	Aprovado/ Reprovado	Aprevodo

Parecer Detalhado da Banca Examinadora

Alteração do título:

Kidro Human de O Carvallo Pedro Henrique de Oliveira Carvalho

Universidade Federal de Goiás - Faculdade de Farmácia Rua 240 esquina com a 5ª Avenida, s/n, Setor Leste Universitário, CEP: 74605-170 Fone: (62) 3209-6036 - <u>www.farmacia.ufg.br</u>



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Vice Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Marize Campos Valadares

Goiânia 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Pedro Henrique de Oliveira Carvalho Orientador(a): Prof.^a. Dr.^a Valéria de Oliveira

Professora Dra. Valéria de Oliveira / Presidente

Professor Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Professora Dra. Evilanna Lima Arruda / Membro Titular

Professor Adjunto da Faculdade de Medicina da Universidade de Rio Verde, FM/UNIRV.

Professora Dra. Maria Teresa Freitas Bara / Membro Titular

Professor Associado IV da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Professora Dra. Mariângela Fontes Santiago / Membro Suplente

Professor Associado IV da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Data: 29/03/2019

"Ore como se tudo dependesse de Deus e trabalhe como se tudo dependesse de você"

- Santo Inácio de Loyola

Agradeço a Deus pela força em mim depositada dia após dia sem a qual não teria chegado ao fim de mais essa etapa.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Valéria de Oliveira, por me inspirar e despertar em mim o desejo de buscar o conhecimento a cada dia, por sua solicitude, paciência, confiança e por toda sua contribuição.

Aos meus pais, Maria da Conceição Oliveira e José Zacarias de Carvalho (*in memoriam*), por todos os incentivos, suporte, amor e acreditarem em mim.

À minha irmã, Kamilla de Oliveira Carvalho, pelo carinho, companhia, compreensão.

Aos colegas do laboratório LaBiocon, Evilanna Arruda; Kamila Bohne Japiassú; Kelly Cordeiro e Paula Melo. Agradeço pela parceria, companheirismo e ajuda técnica/intelectual.

Agradeço à Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, bem como a todos os Laboratórios Colaboradores que ajudaram na construção desse trabalho, especialmente ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LabRMN-IQ/UFG) e o Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (Crti-UFG).

À todos os professores, técnicos e profissionais envolvidos.

À CAPES agradeço pelo incentivo financeiro referente a bolsa de estudo nível mestrado.

E a todos que de alguma forma tenham contribuído direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu muito obrigado!

18
23
20
20
27
28
30
30
32
33
R)34
37
37
37
38
38
38
38
39
39
39
40

	3.5.4. de alta	Cromatografia Liquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas resolução (CLAE-EMAR)41
3	.6. Ava	liação de potenciais de citotoxicidade e atividade antitumoral42
	3.6.1.	Cultivo celular
	3.6.2.	Preparo das substâncias-teste para os ensaios de citotoxicidade43
	3.6.3. sobre a	Determinação da citotoxicidade da Hesperetina e do composto Labiocon 638 i linhagem Balb/c 3T3 para estimativa da DL50 in vitro43
	3.6.4. células	Avaliação da atividade citotóxica da Hesperetina e do Labiocon638 sobre tumorais B16F10, A549 e U937 por meio do método redução do sal de tetrazólio 44
4.	RESUL	TADOS E DISCUSSÃO46
4	.1. Hes	speretina – Caracterização46
4	.2. Mic	rorganismo48
4	.3. Ens	aio em escala semi-preparativa49
	4.3.1.	Identificação dos derivados50
4	.4. Esc	alonamento da reação51
	4.4.1.	Quantificação dos produtos formados e cinética reacional
	4.4.2.	Extração56
	4.4.3.	Purificação do produto obtido56
	4.4.4.	Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear – RMN57
4	.5. Ava	liação de potenciais atividades farmacológicas63
	4.5.1.	Atividade anticâncer63
	4.5.2.	Citotoxidade65
4.6.	Comp	paração entre a escala semi-preparativa e a escala preparativa66
5.	CONCL	_USÃO69
6.	REFER	ÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS70
7.	ANEXC)S79

Figura 1: Estrutura química básica dos subtipos de flavonoides mais comuns
Figura 2: Estrutura química da hesperetina (1)22
Figura 3: Estrutura química da hesperidina (rutinosídeo) (2)22
Figura 4: Estrutura química da hesperetina-7-glicosídeo23
Figura 5: Mecanismo da ligação glicosídica25
Figura 6: Ilustração de uma molécula doadora, uma enzima de glicosilação e moléculas
receptoras
Figura 7: Posições mais favorecidas para a glicosilação da molécula de hesperetina. (1) 3'-
O-glicosídeo; (2) 5-O-glicosídeo, e (3) 7-O-glicosídeo de hesperetina27
Figura 8: Caminhos para a deglicosilação enzimática de hesperidina para produzir
hesperetina-7-O-glicosídeo e hesperetina
Figura 9: Biotransformação do entacapone (1) em entacapone β -glicosilado (2) catalisado
por C. echinulata ATCC 9245
Figura 10: Glicosilação do 4-NRC por <i>Cunninghamella echinulata</i> ATCC 924532
Figura 11: Ilustração de um modelo de funcionamento automatizado de um biorreator de
tanque agitado. Parâmetro controlador automaticamente
Figura 12: Exemplo de identificação de um composto por cromatografia líquida acoplada à
espectrometria de massas. Na imagem, a identificação do composto 1, com sua respectiva
m/z, tempo de retenção e fragmentações35
Figura 13: Fluxograma da extração da escala preparativa40
Figura 14: Fluxograma de purificação do derivado obtido41
Figura 15: Cromatograma acoplado ao íon de m/z 301.07184 mostrando a hesperetina no
tempo de retenção de 28.2146
Figura 16: Ampliação do cromatograma da figura 18, mostrando o valor de área de
23.394.038.439 para uma concentração de 50 p.p.m. de hesperetina47
Figura 17: Espectro de CLAE-EMAR em modo negativo da hesperetina47
Figura 18: Cepa de Cunninghamella echinulata ATCC 9244 utilizada nos estudos de
biotransformação do substrato hesperetina. (1) Antes do repique (2) Após o repique49
Figura 19: Característica de crescimento da cepa de C. echinulata ATCC 9244 em meio
sólido (A) e em meio líquido de PDMS (B). Em (C) verifica-se o branco reacional, meio de
cultura sem adição do microrganismo49

Figura 20: Biorreator de tanque agitado utilizado no escalonamento da reação51 Figura 21: Escalonamento da reação de biossíntese utilizando meio de cultura líquido de PDSM e C. echinulata ATCC 9244 como catalisadores. (A) e (B) aspecto macromorfológico Figura 22: Cromatogramas dos tempos 24h, 48h, 72h e 96h da incubação da hesperetina em biorreator. Os valores de área do pico correspondente ao íon de *m/z* 463,12 em modo negativo correspondente a hesperetina glicosídeo foram utilizados para a determinação da Figura 23: CLAE-EMAR do derivado glicosídeo da hesperetina da fração de extração com Figura 24: Espectro de Massa em modo negativo mostrando a hesperetina glicosídeo com *m*/z de 463,12500 e a fragmentação na molécula da hesperetina *m*/z 301,07181......56 Figura 25: Aspecto do composto após ser submetido ao processo de purificação.57 Figura 26: Análise por cromatografia em camada delgada do produto hesperetina (1) e produto purificado (2). Fase móvel de AcOEt:MeOH 95:5.....57 Figura 27: Esquema da glicosilação regiosseletiva da hesperetina por Cunninghamella echinulata ATCC 9244 na posição 7.....58 Figura 28: Glicosilação de 3-hidroxiflavanona por cultura de células de Cunninghamella echinulata60 Figura 29: Esquema de glicosilação da hesperetina por cultura de células de *Ipomoea* batatas e Eucalyptus perriniana......61 Figura 30: Análise de CLAE da bioconversão enzimática da hesperidina. (A) Hesperidina (B) reação no tempo de 6 h produzindo Hes-7-G e (C) por 12 h com conversão na forma Figura 31: Células de Adenocarcinoma de Pulmão – A549......64 Figura 32: Células de Melanoma – B16F10.....64 Figura 33: Células leucêmicas – U93764 Figura 34: Determinação da citotoxicidade da hesperetina e do composto Labiocon638

Tabela 1: Classificação taxonômica31
Tabela 2: Perfil cromatográfico da hesperetina na análise de CLAE-EMAR46
Tabela 3: Sinais evidenciados no espectro de RMN 1H e 13C da hesperetina48
Tabela 4: Lista dos compostos pesquisados na análise de CLAE-EMAR ao final do
bioprocesso em escala semi-preparativa50
Tabela 5: Valores de área para o derivado hesperetina glicosídeo nas análises de CLAE
EMAR das alíquotas de 0h, 24h, 48h, 72h e 96h53
Tabela 6: Sinais evidenciados no espectro de RMN ¹ H e ¹³ C da hesperetina e seu derivado
hesperetina glicosídeo
Tabela 7: Valores de IC50 Células de Adenocarcinoma de Pulmão - A549; Células de
Melanoma – B16F10; Células leucêmicas – U93765
Tabela 8: IC50 das substâncias hesperetina e hesperetina 7-0-β-D-glicopiranosídeo
(Labiocon 638)

Gráfico 1: Quantidade de hesperetina e hesperetina glicosídeo ao final do tempo de 96
horas em escala semi-preparativa. Valores expressos em função da área do pico
quantificada no CLAE-EMAR51
Gráfico 2: Cinética reacional da biossíntese do derivado hesperetina glicosídeo. Valores de
área em função do tempo determinado por CLAE-EMAR54
Gráfico 3: Comparação entre a pequena e grande escala na proporção, em função da
unidade de área do pico obtido por CLAE-EMAR, de produção do derivado desejado, ao
final de 96 horas em ambos processos67

AcOEt	Acetato de etila	
¹³ C RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono	
¹ H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio	
ATCC	American Type Culture Collection	
B.O.D.	Biochemical oxygen demand	
CCD	Cromatografia em camada delgada	
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	
CLAE-EMAR	Cromatografia Líquida de Alta eficiência acoplada à espectrometria de Massas de Alta resolução	
EM	Espectrometria de Massas	
ESI	Ionização por Eletrospray	
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização electrospray	
GTs	Glicosiltransferases	
Hes-7-G	hesperetina-7-O-glicosídeo	
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation	
LaBiocon	Laboratório de Bioconversão	
MeOH	Metanol	
p.p.m.	Partes por milhão	
PDSM	Potato Dextrose Sucrose Medium	
r.p.m.	Rotações por minuto	
Rf	Fator de retenção	
UDP	Uridina Difosfato	
UGTs	UDP glicosiltransferases	
UV	Ultravioleta	
UV-Vis	Ultravioleta-Visível	

GLICOSILAÇÃO REGIOSSELETIVA DA HESPERETINA CATALISADA POR Cunninghamella echinulata ATCC 9244, EM BIORREATOR.

Carvalho P.H.O.¹

¹ Laboratório de Bioconversão (LaBiocon), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

Introdução: A Hesperetina é um flavonoide da classe das flavanonas, apresenta diversas atividades farmacológicas, sendo a mais citada o potencial antioxidante. Porém, apresenta baixa solubilidade e consequentemente baixa biodisponibilidade, dificultando sua aplicação em formulação farmacêutica sistêmica. A glicosilação da hesperetina modifica efetivamente propriedades farmacocinéticas, aumentando atividade suas sua antidiabética. antilipidêmica e eficácia contra Helicobacter pylori. Fungos filamentosos são usados em processos biotecnológicos para alterar propriedades de moléculas pouco ativas, como exemplo a produção de derivados glicosilados de forma régio e estereosseletivo e com menor citotoxicidade. Cunninghamella pertence à classe dos fungos filamentosos capazes de catalisar reações de glicosilação. Com a necessidade de escalonamento na produção de compostos bioativos, os biorreatores são uma estratégia promissora. Objetivo: O objetivo do trabalho foi realizar a glicosilação regiosseletiva da hesperetina catalisada por Cunninghamella echinulata 9244, em biorreator, tendo em vista suas melhores atividades farmacológicas. Metodologia: A hesperetina foi incubada com o microrganismo em meio PDSM em duas escalas, semi-preparativa (100 mL) e preparativa (2 L). O monitoramento da reação foi realizado por CLAE-EMAR e a caracterização do composto obtido por RMN ¹H¹³C. Foram realizados testes de potencial atividade antitumoral e citotoxicidade. Resultados e discussão: O rendimento da glicosilação na escala semi-preparativa foi de 0,8% enquanto que na escala preparativa o rendimento foi de 22,9%. O aumento do rendimento pode ser explicado pelo controle automatizado dos principais parâmetros como pH e oxigenação do meio reacional. O tempo ideal de biossíntese do derivado glicosilado no biorreator foi de 72 horas. O composto glicosilado purificado foi identificado por RMN em hesperetina 7-O-B-D-glicopiranosídeo com acentuada redução de citotoxicidade. apresentando IC50 9,5 vezes menor que o composto de partida. Conclusões: Foi possível realizar a glicosilação regiosseletiva da hespertina em uma única etapa em biorreator, aumentando o rendimento. O ensaio cromatográfico proposto por CLAE-EMAR permitiu a rápida e eficiente identificação e caracterização dos derivados.

Palavras-Chave: Biotransformação, hesperetina 7-O-β-D-glicopiranosídeo, citotoxicidade.

Agradecimentos: LABIOCON e CAPES.

REGIOSSELECTIVE GLYCOSILATION OF HESPERETIN CATALELIZED BY Cunninghamella echinulata ATCC 9244, IN BIOREACTOR.

Carvalho P.H.O.¹

¹ Laboratório de Bioconversão (LaBiocon), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás.

Introduction: Hesperetina is a flavonoid, belongs to flavanones class, with several pharmacological activities, the most cited being the antioxidant potential. However, it presents low solubility and consequently low bioavailability, making it difficult to apply it in a systemic pharmaceutical formulation. Glycosylation of hesperetin effectively modifies its pharmacokinetic properties, increasing its antidiabetic, antitilipidemic activity and efficacy against helicobacter pylori. Filamentous fungi are used in biotechnological processes to increase the activity of molecules, being able to glycosylate, regio and stereoselective derivatives, with less cytotoxicity. Cunninghamella belongs to the class of filamentous fungi capable of catalyzing glycosylation reactions. With the demand of scale-up the production of bioactive compounds, bioreactors are a promising strategy, providing a controlled Aim: The objective of this work was to scale-up the regioselective environment. glycosylation of hesperetin catalyzed by Cunninghamella echinulata 9244 in a bioreactor, with pharmacological activities improved. Methods: Hesperetin was incubated with the microorganism in PDSM medium on two scales, semi-preparative (100 mL) and preparative (2 L). HPLC-MS was used to monitoring and the caracterization of the product formed was confirmed by ¹H¹³C NMR. Tests of anticancer and cytotoxicity were realized. Results and **Discussion:** The glycosylation yield in the semi-preparative scale was 0.8%, while in the preparative scale the result was 22.9%. The increase in yield can be explained by the automated control of the main parameters such as pH and oxygenation. The ideal time for biosynthesis of the glycosylated derivative in bioreactor was 72 hours. The purified product glycosylated was identified by NMR in hesperetin 7-O-β-D-glucopyranoside, not exhibiting anticancer activity, but with reduction of cytotoxicity, with IC 50 9.5 times lower than the starting compound. **Conclusions:** Regioselective glycosylation of hespertin was performed in a single step in bioreactor, significantly increasing the yield. The chromatographic procedure proposed by the HPLC-MS allowed a fast and efficient identification and characterization of the derivative.

Keywords: Biotransformation, hesperetin, glycosylation, bioreactor, Cunninghamella.

Acknowledgements: LABIOCON and CAPES.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Flavonoides

Os flavonoides são uma classe de metabólitos secundários amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados na maioria das frutas e vegetais (LE GALL *et al.*, 2003). Nas espécies vegetais, os flavonoides são biossintetizados via uma combinação da rota do acetato/malonato e a rota do ácido chiquímico a partir dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e malonil-CoA (HAVSTEEN, 2002). Consistem em um grande grupo de compostos polifenólicos de baixo peso molecular, formados por um núcleo benzopirano ligado a um anel aromático, formando o núcleo fundamental dos flavonoides, o fenil-benzopirano (HAVSTEEN, 2002). Sua estrutura molecular geral (figura 1) consiste em dois anéis benzênicos (A e B), onde o anel A está condensado com o anel C, este último possuindo um átomo de oxigênio (WANG *et al.*, 2017).

Figura 1: Estrutura química básica dos subtipos de flavonoides mais comuns



Estrutura básica dos flavonoides



Fonte: Adaptado de Hodek e colaboradores (2002)

Nas plantas estão presentes nos pigmentos sintetizados a partir da fenilalanina, membros de uma classe de compostos naturais que recentemente tem sido objeto de considerável interesse científico e terapêutico, além de regular o crescimento das plantas pela inibição da exocitose do ácido indolilacético da auxina, bem como por indução da expressão gênica e influenciam outras células biológicas (SLÁMOVÁ; KAPEŠOVÁ; VALENTOVÁ, 2018).

Acredita-se que a atividade antioxidante dos flavonoides reduza o tempo de envelhecimento das células e proteja contra a peroxidação lipídica, uma reação que pode ser um passo importante no desenvolvimento de doenças como doenças cardiovasculares ou coronarianas e inflamação crônica (CERQUEIRA; DE MEDEIROS; AUGUSTO, 2007). Sua estrutura química (C6-C3-C6) torna-os bons doadores de hidrogênio e elétrons, pois consistem em dois anéis aromáticos unidos por uma ligação de três carbonos (AHERNE; O'BRIEN, 2002). Essas características garantem uma efetiva eliminação de radicais livres, como os produtos de peroxidação lipídica, que são gerados por reações em cadeia oxidativas e levam ao dano tecidual ao longo do tempo (PIETTA, 2000).

Os flavonoides inibem parcial ou totalmente o crescimento de muitas bactérias, inibem importantes enzimas virais (como transcriptase reversa e protease) e chegam a agir eficazmente em alguns protozoários patogênicos. No entanto, sua toxicidade para células animais é baixa (WANG *et al.*, 1994).

Na alimentação, a ingestão diária de flavonoides presentes especialmente em frutas e legumes é de 1 - 2 g. São bastante usados na medicina para tratar diversas doenças, devido à sua capacidade comprovada de inibir enzimas específicas, simular alguns hormônios e neurotransmissores e eliminar os radicais livres (WANG; ZHENG, 1992; XIAO; CHEN; CAO, 2014). Eles têm sido reconhecidos como agentes com ação anti-inflamatória e antioxidante, atuantes contra a obesidade e síndrome metabólica (PIETTA, 2000).

Ademais, apesar do potencial biológico descrito na literatura, a dificuldade de solubilidade de alguns flavonoides, como morina e hesperetina, altera sua biodisponibilidade e com isso outras propriedades cinéticas, bem como a farmacodinâmica e assim o efeito esperado. Estudos sobre associações entre estrutura e destino biológico se fazem necessário, bem como relações entre estrutura-atividade e farmacocinética dos flavonoides bioativos (WANG *et al.*, 2017).

19

Apesar dos intensos estudos sobre absorção e metabolismo de flavonoides, vários assuntos ainda não foram completamente elucidados. Não está claro se eles são absorvidos como agliconas, glicosídeos ou em ambas as formas (SORDON; POPŁOŃSKI; HUSZCZA, 2016). Sabe-se, no entanto, que o tipo de molécula de açúcar nos glicosídeos dos flavonoides influencia sua absorção, distribuição e até mesmo em seu metabolismo (XIAO; CHEN; CAO, 2014).

Observou-se que, após a administração oral de glicosídeo de quercetina, a concentração máxima de quercetina no plasma foi 20 vezes maior do que após a ingestão de quercetina rutinosídeo. Isto pode ser explicado pelo fato de o glicosídeo de quercetina ser absorvido a partir do intestino delgado de forma inalterada, enquanto a absorção de seu rutinosídeo ocorra somente após sua deglicosilação (HOLLMAN *et al.*, 1999).

Para serem absorvidos, os flavonoides devem atingir o intestino delgado na forma inalterada. A maioria dos glicosídeos de flavonoides mantém suas estruturas mesmo após o processo de digestão. São moléculas resistentes ao baixo pH e às enzimas digestivas encontradas no estômago. A absorção de flavonoides presentes em alimentos depende de suas propriedades físico-químicas, tamanho das moléculas, característica lipofílica e solubilidade (SORDON; POPŁOŃSKI; HUSZCZA, 2016; TRONINA *et al.*, 2017).

Flavonoides em sua forma aglicona podem ser transportados por difusão passiva, enquanto a conjugação com sacarídeos aumenta as propriedades hidrofílicas do composto, o que o torna mais solúvel em água e menos capaz de difusão passiva. Glicosídeos de flavonoides podem ser ativamente transportados por canais de sódio e de glicose do lúmen intestinal para o interior dos enterócitos, onde são posteriormente clivados em suas formas agliconas por glicosidases citosólicas (KUMAR; PANDEY, 2013).

Como a absorção dos glicosídeos de flavonoides no intestino delgado é fraca, sugere-se que esses glicosídeos sejam hidrolisados pela β -glicosidase, secretada pelas células epiteliais do intestino delgado humano, conhecida como LPH (*lactase phloridzin hydrolase*) (KUMAR; PANDEY, 2013). A LPH é caracterizada pela alta especificidade com substrato e os glicosídeos que não são substratos desta enzima são transportados para o intestino grosso, onde são hidrolisados pelas enzimas provenientes de bactérias intestinais (por exemplo, α -arabinofuranosidase, α -frutosidase, α -ramnosidase, β -frutosidase, β -glicosidase e β -glicuronidase). As agliconas são absorvidas no cólon (CAO *et al.*, 2015a; KUMAR; PANDEY, 2013; XIAO; CHEN; CAO, 2014).

Nas células intestinais, os flavonoides geralmente sofrem metabolismo de fase II, ou seja, são conjugados com ácido glicurônico pela UDP-glucuronosiltransferase ou conjugados pelas sulfotransferase. Os flavonoides que contêm uma porção catecol são metilados pelo catecol-*O*-metiltransferase. A partir do intestino, os flavonoides são transportados para o fígado através da corrente sanguínea, onde podem ser desconjugados e novamente conjugados com ácido glicurônico ou sulfatos com a ajuda de enzimas, como β-glicuronidase e sulfatase. Podem também ser metabolizados em compostos fenólicos menores (KUMAR; PANDEY, 2013).

Em seguida, os flavonoides glicuronidados e sulfatados formados no fígado são distribuídos pelo sangue aos tecidos de todo o organismo. O excesso dos flavonoides não se acumula no organismo (DESMET *et al.*, 2012).

Os flavonoides absorvidos no intestino são eliminados na urina, enquanto os que não foram absorvidos são eliminados nas fezes (XIAO; MUZASHVILI; GEORGIEV, 2014).

1.1.1. Hesperetina, hesperidina e hesperetina glicosídeo.

A Hesperetina (3',5,7-Trihidroxi-4'-metoxiflavanona) (figura 2) é um flavonoide da classe das flavanonas disponível em frutas cítricas como a laranja e a *grapefruit* (ERLUND *et al.*, 2001). É um composto orgânico aromático de espécies vegetais do gênero *Citrus*, que pode ocorrer tanto na aglicona (forma livre, ou seja, sem moléculas de açucares) ou ligado a resíduos de açúcar (glicosídeos/heterosídeos (HAVSTEEN, 2002).

Trabalhos publicados demonstraram que a hesperetina (aglicona) apresenta efeito antioxidante (WANG *et al.*, 2013), anti-inflamatório (YANG *et al.*, 2012), anticâncer (SO *et al.*, 1996; COUTINHO *et al.*, 2017), imunomodulador (SANGPHEAK *et al.*, 2015), neuroprotetor (ERLUND, 2004), antidiabético (GONG *et al.*, 2017) e potencial efeito antiangiogênico (CHOI *et al.*, 2006) em modelos animais. Entretanto, sua baixa solubilidade em água é um grande desafio para atingir uma boa biodisponibilidade e consequentemente, boa ação farmacológica (LIU; CHEN, 2008).

Figura 2: Estrutura química da hesperetina (1).



Nos alimentos, está presente em maior quantidade como um rutinosídeo, denominado hesperidina (hesperetina 7-rhamnoglicosídio) (Fig. 3), sendo este o flavonoide mais abundante em frutos cítricos. Na hesperidina, a aglicona (hesperetina) está ligada a uma glicose e uma ramnose na posição 7 (LAHMER *et al.*, 2015).

Figura 3: Estrutura química da hesperidina (rutinosídeo) (2).



Portanto, apesar da hesperetina rutinosídeo (2) ser a mais abundante encontrada, apresenta menor biodisponibilidade quando comparada com a hesperetina (aglicona) e hesperetina-7-glicosídeo (figura 4). Isto é explicado devido à hesperidina possuir um grupo de rutinose, sendo hidrolisada apenas na parte distal do intestino e no cólon por bactérias da microbiota, em contraste com a hesperetina glicosídeo, que possui apenas uma porção glicose, sendo hidrolisada no intestino delgado pelas beta-glicosidases (KANAZE *et al.*, 2007; NIELSEN *et al.*, 2006)

Figura 4: Estrutura química da hesperetina-7-glicosídeo.



A baixa biodisponibilidade da hesperidina e a baixa solubilidade da hesperetina se torna um grande entrave para sua aplicação de efeito sistêmico.

Um estudo comparando a solubilidade, a atividade antidiabética e a atividade antilipidêmica das três estruturas derivadas desse flavonoide hesperetina (aglicona, glicosilada e rutinosídeo) mostrou que em hesperetina-7-O-glicosídeo (figura 4) apresentou maior solubilidade, maior efeito antidiabético e maior efeito antilipidêmico, confirmando que esse flavonoide é mais eficaz e biodisponível que a hesperidina e hesperetina (LEE *et al.*, 2012).

1.2. Glicosilação de flavonoides

A glicosilação é um método importante para a modificação estrutural de compostos biologicamente ativos. Ela permite a conversão de compostos lipofílicos em hidrofílicos, modificando, dessa forma, as suas propriedades farmacocinéticas, como por exemplo, a sua circulação, eliminação e concentrações nos fluidos corporais (RIVAS *et al.*, 2013). Kaminaga et al. (2003) relataram que a glicosilação é muito mais eficaz que a complexação com ciclodextrina no aumento da solubilidade em água de compostos hidrofóbicos.

A glicosilação de flavonoides aumenta a sua solubilidade em água e, assim, aumenta a sua biodisponibilidade (SLÁMOVÁ; KAPEŠOVÁ; VALENTOVÁ, 2018). Os glicosídeos são como "pró-fármacos", que melhoram a solubilidade das agliconas ligando-as aos transportadores de açúcar (XIAO, 2017).

Na natureza, os flavonoides ocorrem principalmente na forma de glicosídeos, mas sua extração é muitas vezes difícil e onerosa. As principais estratégias biológicas utilizadas para obter a glicosilação de flavonoides em laboratório envolvem engenharia de vias metabólicas e biotransformação microbiana, uma vez que; por via da química orgânica clássica requer várias etapas, entre elas de proteção e desproteção, em altas temperaturas, consumindo grande quantidade de solventes orgânicos tóxicos e por fim necessitando de um árduo trabalho para obtenção de um produto régio e estereosseletivo (CAMPO; CARVALHO, 2008; LUSTOSA *et al.*, 2012; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2004).

Doses orais de flavonoides em sua forma agliconas são menos biodisponíveis do que seus glicosídeos, porque são mais suscetíveis à fissão do anel de sua estrutura básica. Mais de 2000 flavonoides são conhecidos com quase 500 ocorrendo no estado livre (aglicona) e o resto como O- ou C-glicosídeos. Com o tratamento *in vivo* (oral), os flavonoides glicosilados apresentaram anti-inflamatória, anti-stress e anti-histamínica semelhante ou até maior que suas respectivas agliconas (XIAO, 2017).

A deglicosilação dos ramnosídeos para a forma de glicosídeo é comumente utilizada na indústria alimentícia, com o objetivo de melhorar as propriedades sensoriais das bebidas amargas, como os sucos cítricos ou o aumento dos aromas dos vinhos (RIBEIRO, 2011; YADAV *et al.*, 2010).

Os flavonoides naturais quase todos existem como suas formas O-glicosídeo ou Cglicosídeo. O-glicosilação geralmente pode aumentar certos tipos de benéficos, incluindo atividades anti-HIV, antirotavirus, anti-stress, anti-obesidade, antilipidêmica, potencial anticolinesterase, inibição da tirosinase, entre outras (WANG *et al.*, 1994).

A glicosilação enzimática geralmente emprega glicosiltransferases e glicosidases. As glicosidases tipicamente catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas. Contudo, sob condições reacionais apropriadas, estas enzimas também podem ser utilizadas em hidrólise reversa para a síntese de glicoconjugados, embora os rendimentos sejam geralmente baixos (CAMPO; CARVALHO, 2008).

Ao contrário das glicosidases, as glicosiltransferases (GTs) são enzimas que evoluíram naturalmente para reações de glicosilação. As GTs transferem porções de açúcar através de doadores de açúcar ativados para moléculas aceitadoras com alta eficiência e regioespecificidade. Muitas GTs de mamíferos e de microrganismos têm sido empregadas para a síntese de oligossacarídeos e glicosídeos, como exemplo dos antibióticos. Nos últimos anos, muitas sequências de GT de plantas foram identificadas e suas proteínas

24

recombinantes correspondentes analisadas *in vitro*, porém seu uso na biocatálise ainda tem sido limitado (LIM, 2005).

O mecanismo geral de formação dessa ligação na grande maioria das reações de glicosilação conhecidas segue o mecanismo descrito para o método proposto por Koenigs e Knorr, em 1901. Essa ligação é formada pela substituição nucleofílica de um grupo abandonador (X) ligado ao carbono anomérico de um carboidrato por um grupamento alcoxila de um álcool (R-OH) ou um açúcar parcialmente protegido. A taxa de reação será aumentada na presença de um ativador, geralmente um ácido de Lewis, que é chamado de "promotor" (Figura 5). O papel deste promotor é auxiliar a saída do grupo abandonador X (PELLISSIER, 2005; WEIJERS; FRANSSEN; VISSER, 2008).

Figura 5: Mecanismo da ligação glicosídica



Fonte: Adaptado de Pellissier (2005).

As glicosiltransferases de difosfato de uridina desempenham papéis-chave na conjugação de flavonoides com açúcares. Ferramentas modernas de engenharia metabólica e proteômica têm sido utilizadas para gerar numerosos glicosídeos de flavonoides estruturalmente diversos. *In vitro*, a glicosilação enzimática tende a gerar preferencialmente flavonoides 3- e 7-*O*-glicosídeos. Microrganismos tipicamente convertem flavonoides em seus 7-*O*-glicosídeos e produzirão 3-*O*-glicosídeos se forem fornecidos com substratos flavonoides tendo um grupo hidroxila na posição C-3 (XIAO; MUZASHVILI; GEORGIEV, 2014).

As reações catalisadas pelas glicosiltransferases são estereosseletivas e regiosseletiva e a transferência pode ocorrer com retenção ou inversão da configuração no carbono anomérico do açúcar transferido (PALCIC, 2011).

As glicosiltransferases foram classificadas por homologia de sequência de aminoácidos, especificidade de substrato e estereoquímica de ligação glicosídica em 96 famílias (GLOSTER, 2014). Uma delas compreende a UDP-glicosiltransferases (UGTs), encontradas em plantas, animais, fungos e bactérias. Essas enzimas usam a porção de açúcar ativada por UDP como doadora de sacarídeo e moléculas como flavonoides, alcaloides, antibióticos e hormônios vegetais como os receptores (HYUNG; GYU KIM; JOONG-HOON, 2006).

Figura 6: Ilustração de uma molécula doadora, uma enzima de glicosilação e moléculas receptoras.



1.2.1. Flavonoides O-glicosídeos

Apesar de que qualquer grupo hidroxila na estrutura dos flavonoides possa ser glicosilado, algumas posições são favorecidas na natureza. Os locais mais comuns são as hidroxilas da posição 3'-, 5- e 7 (Figura 7) (HIROMOTO *et al.*, 2015).

Figura 7: Posições mais favorecidas para a glicosilação da molécula de hesperetina. (1) 3'-O-glicosídeo; (2) 5-O-glicosídeo, e (3) 7-O-glicosídeo de hesperetina.



A mais numerosa subclasse de flavonoides glicosídeos compreende os *O*glicosídeos (VEITCH; GRAYER, 2011). De acordo com o comprimento de uma cadeia de açúcar, os flavonoides *O*-glicosídeos são dividido em monossacarídeo, dissacarídeo, trissacarídeo e tetrassacarídeo. Cadeias de açúcar mais longas são raramente observadas (YANG, B. *et al.*, 2018).

Os doadores de açúcar incluem principalmente glicose, ramnose, galactose, xilose e ácido glicurônico. A glicosilação é o padrão mais frequente de glicosídeos de flavonoides. Embora a glicose tenha dois tipos de configuração relativa ($\alpha \in \beta$), a maior parte dos glicosídeos de flavonoides está presente como β -glicopiranosídeo. O α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glicosídeo e o α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicosídeo são dois dissacarídeos mais frequentes frequentemente (VEITCH; GRAYER, 2011).

1.2.2. Glicosilação da hesperetina

O consumo de hesperetina na dieta é representado pela ingestão de frutas cítricas e sucos (KNEKT *et al.*, 2002). Para garantir a biodisponibilidade da hesperetina é importante explorar plenamente suas propriedades benéficas. Baixas concentrações plasmáticas de hesperetina aglicona (menos que 2 µmol/L) após a ingestão de suco de laranja (1 L) indicaram baixa biodisponibilidade em voluntários humanos (ERLUND *et al.*, 2001).

Os flavonoides estão comumente presentes em plantas conjugados a glicosídeos. A porção de açúcar dos flavonoides sugere ser o principal determinante da sua absorção em

humanos, enquanto os glicosídeos com ramnose são pouco absorvidos em comparação com as suas agliconas e formas glicosídicas (HOLLMAN *et al.*, 1999).

Recentemente, foi demonstrado que a remoção enzimática do açúcar ramnose da hesperidina (figura 8) para produzir hesperetina-*O*-7-glicosídeo (Hes-7-G) melhorou sua biodisponibilidade em três vezes (VISSER *et al.*, 2003). Além disso, a bioconversão de hesperidina a Hes-7-G altera o local de absorção do cólon para o intestino delgado e melhora sua biodisponibilidade em sucos e chás (BREDSDORFF *et al.*, 2010). Isto mostra que a porção de açúcar é um determinante do sítio de absorção e biodisponibilidade do flavonoide (HABAUZIT *et al.*, 2009).

Figura 8: Caminhos para a deglicosilação enzimática de hesperidina para produzir hesperetina-7-O-glicosídeo e hesperetina.



1.3. Atividade Anticâncer e citotóxica de Glicoconjugados

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, e atinge pessoas de todos os estratos socioeconômicos da população. A principal característica que define o câncer é a criação rápida de células anormais que crescem além dos seus limites habituais, podendo assim, invadir células adjacentes do corpo (FERLAY *et al.*, 2014; PANIS *et al.*, 2018).

Segundo o informativo sobre câncer da OMS, em 2018 houve cerca de 18 milhões de casos de câncer em todo o mundo, desses 9,5 milhões de casos em homens e 8,5 milhões em mulheres. Neste ano, 9,6 milhões de mortes por câncer foram reportadas (BRAY *et al.*, 2018).

Estes números são surpreendentes diante dos recursos e esforços que têm como alvo a doença e o grande número de fármacos anticâncer que foram aprovadas para uso clínico. A conclusão dessas observações é que os fármacos não foram tão eficazes quanto desejados. De fato, existem certos tipos de câncer, como o câncer de pâncreas, para o qual não existem medicamentos eficazes e, além disso, não há tratamentos eficazes para cânceres em estágio avançado que tenham sofrido metástase (BLUMENTHAL; GATTI; ZUNINO, 2005).

Embora o desafio de detectar o câncer precocemente seja responsável por uma grande proporção das mortes, isso não é a única razão para a falta de eficácia do tratamento. As células cancerígenas desenvolveram várias estratégias para evitar serem mortas por esses medicamentos e os tumores se tornaram resistentes aos medicamentos (BLUMENTHAL; GATTI; ZUNINO, 2005; KRUH, 2003).

O desenvolvimento estratégico de agentes terapêuticos capazes de serem direcionados aos seus sítios de ação tem sido um dos principais objetivos no tratamento dessa doença. "Drug delivery" (ou direcionamento de fármacos) é o termo utilizado no emprego de determinadas moléculas que estejam ligadas ao composto ativo, servindo assim, como carreadores, melhorando a eficácia do fármaco. Nesse contexto, a entrega de fármacos para tumores tem como principal desafio o desenvolvimento de fármacos seguros e eficazes, uma vez que, o objetivo da quimioterapia consiste na eliminação completa tumor sem atingir células sadias (AGARWAL *et al.*, 2007).

As moléculas de açúcar são fontes de energia para muitos processos metabólicos, o que a faz estar presente em todo o organismo. Isso facilita seu reconhecimento, e consequentemente, a sua entrada na maioria das células por meio de transporte ativo (PASTUCH-GAWOŁEK *et al.*, 2016). Nesse sentido, glicoconjugados especialmente reconhecidos por lectinas de membrana podem ser utilizados como transportadores de diferentes compostos ativos (AGARWAL *et al.*, 2007).

1.4. Glicosilação microbiana

A biotransformação é uma reação bioquímica que é catalisada por células inteiras (microrganismos, células vegetais e células animais) ou por enzimas, útil e eficaz na modificação de alguns produtos naturais, com a capacidade de realizar reações régio e estereosseletivas, em condições brandas (XU *et al.*, 2016).

A glicosilação microbiana é uma ferramenta biotecnológica muito utilizada para contornar problemas físico-químicos de uma série de compostos (LIU *et al.*, 2017). Metabólitos secundários produzidos por microrganismos podem ser obtidos em maiores quantidades por processos fermentativos (KUHAD; SINGH; ERIKSSON, 1997).

Os microrganismos possuem algumas características importantes que justificam sua grande aplicação biotecnológica, dentre elas: facilidade de adaptação em diversos ambientes, o que permite transpor um microrganismo da natureza para o laboratório e posteriormente cultivá-lo em escala industrial; possuem um rápido mecanismo de adaptação e assimilação de fontes de carbono e nitrogênio, além de altas taxas de metabolismo e biossíntese; podendo realizar uma grande variedade de reações; possibilidade de manipulação genética e capacidade de biossíntese de enantiômeros específicos, potencialmente ativos, o que dificilmente ocorre na química sintética (ARISTIDOU; PENTTILÄ, 2000).

Fungos filamentosos têm sido utilizados para a produção de medicamentos e alimentos, ajudando a resolver problemas difíceis para a química, como a funcionalização de carbonos não ativados, a remoção sustentável de poluentes em áreas contaminadas e a produção de novos fármacos (BAYDOUN *et al.*, 2016; SANCHEZ; DEMAIN, 2002). Os processos químicos associados a este uso são bem conhecidos e a importância industrial e ecológica dos fungos é inegável (ANTECKA; BIZUKOJC; LEDAKOWICZ, 2016).

1.4.1. Cunninghamella sp.

Cunninghamella é um gênero de um fungo filamentoso encontrado no solo e no material vegetal, particularmente em zonas mediterrânicas e subtropicais. O gênero *Cunninghamella* contém espécies de importância na micologia médica e em processos biotecnológicos, devido a sua extensa capacidade de metabolizar uma ampla variedade de xenobióticos de modos regio e estereosseletivos semelhantes aos aqueles existentes em sistemas enzimáticos de mamíferos (ASHA; VIDYAVATHI, 2009).

30

O gênero contem 14 espécies sendo a *C. bertholletiae*, *C. elegans* e *C. echinulata* as mais comuns. As espécies de *Cunninghamella* foram relatadas capazes de catalisar reações de hidroxilação, glicosilação, desmetilação, ciclização e reações de sulfatação. Novas biotransformações utilizando esse microrganismo indicam que este modelo microbiano representa uma alternativa atraente para a biossíntese de novos compostos, principalmente aqueles com atividade farmacológica melhorada (MA *et al.*, 2007; PEKALA; KUBOWICZ; LAZEWSKA, 2012).

Tabela 1: Classificação taxonômica.

REINO	Fungi
FILO	Zygomycota
ORDEM	Mucorales
FAMÍLIA	Cunninghamellaceae
GÊNERO	Cunninghamella

Fonte: (ASHA; VIDYAVATHI, 2009)

Inúmeras reações de glicosilação já foram descritas por essa espécie *C. echinulata*. Como exemplo, tem-se a biotransformação do entacapone, um inibidor da catecol-Ometiltransferase (COMT) utilizado no tratamento de Parkinson, por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 (figura 9), produzindo um derivado β-glicosilado na posição 3', com um rendimento de 18%, em conformidade com princípios da química verde (LUSTOSA *et al.*, 2012).

Figura 9: Biotransformação do entacapone (1) em entacapone β -glicosilado (2) catalisado por *C. echinulata* ATCC 9245.



Fonte: Adaptado de Lustosa e colaboradores (2012)

O fungo *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 também foi utilizado na biotransformação do 4-nerolidilcatecol (4-NRC), o metabólito secundário majoritário das plantas *Pothomorphe peltata* e *Pothomorphe umbellata*, que possui atividade antioxidante, antimalárica, anti-inflamatória e anti-HIV. A incubação produziu um derivado glicosilado, o

4-Nerolidilcatecol-3'-β-O-glicosídeo (figura 10), com potencial atividade antioxidante, superior ao 4-NRC (CORDEIRO *et al.*, 2013)





Fonte: Adaptado de Cordeiro e colaboradores (2013).

1.4.2. Regiosseletividade

A glicosilação regiosseletiva de produtos naturais continua sendo uma tarefa onerosa para químicos orgânicos, muitas vezes devido à presença de múltiplos grupos hidroxila reativos. O uso de biocatalizadores, como microrganismos, abriram novas oportunidades de modificação devido à sua alta seletividade, simplicidade e condições de reação moderadas; além de serem ecologicamente correto (WANG *et al.*, 2013).

Dado o fato de que os glicosídeos serem capazes de acessar uma ampla gama de espaço químico único, os açúcares ligados a produtos naturais podem claramente complementar e expandir o produto químico, formando uma diversidade das moléculas. Por isso, a necessidade de desenvolver ferramentas de glicosilação regiosseletiva acessíveis e de baixo custo (TRONINA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2013)

Os microrganismos possuem algumas características importantes que justificam sua grande aplicação biotecnológica, podem realizar uma grande variedade de reações; possibilidade de manipulação genética e capacidade de biossíntese de enantiômeros específicos, geralmente ativos, o que dificilmente ocorre na química sintética (ARISTIDOU; PENTTILÄ, 2000).

1.5. Escalonamento de reação

Em meados da década de 1940, com o surgimento dos antibióticos, várias empresas farmacêuticas começaram a buscar métodos para o aumento da produção e comercialização de tais produtos. Naquela época a produção da penicilina já se apresentava como um desafio para uma produção em larga escala, surgindo, então, a necessidade de novas metodologias. O uso de frascos de agitação e, posteriormente, os biorreatores com agitação mecânica aerada começaram a ser utilizados na fabricação de antibióticos em grande escala (HUMPHREY, 1998).

Biorreatores emergiram como reatores biológicos cuja função principal foi de proporcionar um ambiente controlado (figura 11) com adequada concentração de nutrientes para que ocorram reações químicas catalisadas por biocatalisadores, podendo ser enzimas ou células vivas (microbianas, animais ou vegetais) (GARCÍA-OCHOA; GÓMEZ, 2009; LIU *et al.*, 2006)

Figura 11: Ilustração de um modelo de funcionamento automatizado de um biorreator de tanque agitado. Parâmetro controlador automaticamente.



Fonte: Adaptado de Guzman-Rodriguez e colaboradores (2018)

Vários fatores como temperatura de incubação, composição do meio de cultura, pH, agitação e aeração podem contribuir para diferentes morfologias dos fungos filamentosos, assim como o tipo e a concentração do substrato de carbono, os níveis de nitrogênio e fosfato, quantidade de oxigênio dissolvido e o dióxido de carbono, o pH e a temperatura (PAPAGIANNI, 2004). A alta complexidade dos tipos morfológicos e a interação direta entre morfologia e condições reacionais exigem que tais parâmetros sejam bem determinados (KRULL *et al.*, 2013).

Em bioprocessos aeróbicos o oxigênio é um substrato chave, e devido à sua baixa solubilidade em soluções aquosas é necessário seu fornecimento contínuo. A taxa de transferência de oxigênio deve ser conhecida e, se possível, prevista a obtenção de uma operação ideal de projeto e aumento de escala dos biorreatores. Muitos estudos foram realizados para aumentar a eficiência da transferência de oxigênio. A concentração de oxigênio dissolvido em uma suspensão de microrganismos aeróbicos depende da taxa de transferência de oxigênio da fase gasosa para o líquido, da taxa na qual o oxigênio é transportado para as células (onde é consumido) e da taxa de consumo de oxigênio pelo microrganismo para crescimento, manutenção e produção de seus metabolitos (GARCÍA-OCHOA; GÓMEZ, 2009)

A maioria dos processos microbianos industriais é aeróbico e são realizadas em meio aquoso contendo sais e substâncias orgânicas; geralmente estes caldos são viscosos, mostrando um comportamento não-Newtoniano. Nestes processos, o oxigênio é um nutriente importante que é usado por microrganismos para crescimento, manutenção e produção de metabólitos. A escassez de oxigênio afeta o desempenho do processo, sendo o oxigênio peça chave para o escalonamento de qualquer bioprocesso (CLARKE; CORREIA, 2008).

1.6. Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EMAR)

Nos últimos anos, o desenvolvimento da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (CLAE-EMAR) ocorreu rapidamente, tornandose uma ferramenta analítica útil e eficaz, amplamente aplicada em muitas áreas da química, ciências farmacêuticas e bioquímicas. Recentes desenvolvimentos instrumentais em interface CLAE-EMAR, ionização e análise de massa são aplicados na triagem de novos fármacos e bioanálises, assim como em estudos iniciais de adsorção precoce, distribuição, metabolismo e estudos de excreção (NIESSEN, 2003). A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (FARIAS; MENDEZ, 2014).

A cromatografia combinada com vários sistemas de detecção diferentes é uma das ferramentas analíticas mais usadas e de melhor desempenho. A cromatografia com detecção de espectrometria de massa em série fornece análises altamente seletivas e sensíveis e permite obter informações estruturais sobre os analitos e sobre suas massas molares. Devido a estas características, esta técnica analítica é muito eficiente quando usada para detectar substâncias em níveis de traços em matrizes complexas (LEE, M. S., 2002).

Para que o acoplamento seja possível, idealmente, é necessário que as características de cada instrumento não sejam afetadas pela sua conexão, assim como não devem ocorrer modificações químicas do analito e perda de amostra durante a sua passagem do cromatógrafo para o espectrômetro de massa. As técnicas cromatográficas mais comumente acopladas à espectrometria de massas ("*mass spectrometry*") - EM são a cromatografia gasosa ("*gas chromatography*") - CG e a cromatografia líquida de alta eficiência ("*high performance liquid chromatography*") - CLAE (NIESSEN; TINKE, 1995).

Figura 12: Exemplo de identificação de um composto por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Na imagem, a identificação do composto 1, com sua respectiva m/z, tempo de retenção e fragmentações.



Fonte: Adaptado de Farias e Mendez (2014).

Uma das principais vantagens de se acoplar a cromatografia à EM é que a EM permite a identificação de compostos com alto grau de similaridade, o que não seria possível apenas com base nas características de tempo de retenção/eluição dos compostos, fornecidas por outros detectores normalmente utilizados em CLAE e CG. A combinação da espectrometria com a capacidade de separação da cromatografia faz com que, na maioria das vezes, compostos puros sejam introduzidos no espectrômetro de massas, de maneira que possam ser identificados de forma inequívoca (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Além disso, métodos que possam identificar os produtos formados durante a reação facilitam a avaliação da cinética reacional, permitindo identificar e interromper o processo no máximo rendimento obtido.
2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar a glicosilação regiosseletiva da hesperetina catalisada por *Cunninghamella echinulata* 9244, em biorreator.

2.2. Objetivos específicos

- Escalonar a reação para uma possível aplicação industrial;
- Desenvolver e aplicar metodologias de monitoramento das cinéticas reacionais e processos de purificação dos derivados de interesse;
- Caracterizar estruturalmente os derivados obtidos;
- Avaliação de potenciais atividades farmacológicas
 - Determinação da citotoxicidade sobre a linhagem Balb/c 3T3;
 - Avaliação da atividade citotóxica sobre células tumorais B16F10, A549 e U937 por meio do método redução do sal de tetrazólio;
 - Avaliação do potencial anticâncer.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Substrato

O substrato hesperetina (3',5,7-Trihydroxy-4'-methoxyflavanone) foi adquirido através da empresa Sigma Aldrich®, apresentando uma pureza igual ou superior a 95%, fórmula molecular C₁₆H₁₄O₆ e massa molar de 302.28 g/mol. Apresenta como pó inodoro e com ponto de fusão de 227-232 °C. Antes dos experimentos serem iniciados, foi realizada a caracterização desse composto através de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN 1H e 1H-13C HSQC/HMBC e técnicas cromatográficas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para sua identificação.

3.2. Microrganismo: manutenção e repique

A cepa escolhida foi *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 devido a sua capacidade de realizar reações de glicosilação de uma vasta gama de compostos em estudos anteriores realizados em laboratório (ARAÚJO *et al.*, 2013; ARRUDA *et al.*, 2016; LUSTOSA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2016).

A cepa *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, oriunda da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC), Rockville, Maryland, USA, foi conservada em ágar batata inclinado e armazenada em refrigerador entre 2 e 4 °C. Antes do uso, a cepa foi repicada com solução de glicerol estéril 25% v/v em ágar batata e incubado a 27°C por 7 dias em câmara germinativa do tipo *Biochemical oxygen demand* (B.O.D. Modelo TE 401 Tecnal®) para crescimento da cultura. Após este período, verificou-se o aspecto macroscópico da colônia para confirmar o crescimento adequado sem possíveis contaminações.

3.3. Meio de cultura

O meio líquido usado foi o *Peptone Dextrose Soy Medium* – PDSM. O meio PDSM possui 5 g de peptona bacteriológica (Biolog®), 5 g de lecitina de soja (Biolog®), 5 g de KH₂PO₄ (Neon®), 5 g de NaCl (Dinâmica®), 20 g de glicose anidra (Synth®) e 3 g de extrato de levedura (Biolog®) para 1000 mL de água destilada (COSTA *et al.*, 2008). Foi esterilizado em autoclave a 121°C e 1 atm por 15 minutos e distribuído nos erlenmeyers para escala semi-preparativa e no biorreator para a escala preparativa.

3.4. Biotransformação em escala semi-preparativa

A cepa *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 foi selecionada para incubação em escala semi-preparativa com a hesperetina, utilizando 10 *Erlenmeyers* de 250 mL de boca larga com 100 mL de meio de cultura líquido PDSM e concentração de 0,25 mg/mL de substrato. Os *Erlenmeyers* contendo 100 mL do meio líquido previamente autoclavados foram inoculados com uma gota da solução de glicerol contendo suspensão de esporos fúngicos, contendo número de células correspondente a 17×10^{5} . Após a inoculação, os *Erlenmeyers* foram incubados sob agitação de 200 r.p.m. a 27 °C ± 2 em agitador rotativo (Modelo TE 424, *Tecnal*®) por um período de 65 horas. Em seguida foram adicionados 25 mg de hesperetina diluída em 1 mL de acetona em cada *Erlenmeyer*. Os *Erlenmeyers* foram novamente incubados no agitador rotativo a 200 rpm e 27° C ± 2, onde foram mantidos por 96 horas. Um *erlenmeyer* serviu como controle negativo do fungo, contendo o meio de cultura líquido e o substrato diluído em acetona (hesperetina). Um segundo *erlenmeyer* serviu como controle negativo do fungo, contendo o meio de cultura líquido sob as mesmas condições de incubação que os demais. Ao final de 96 horas, uma alíquota foi retirada para identificação dos metabólitos formados.

3.5. Biotransformação em escala preparativa - escalonamento da reação

Um biorreator (*Tecnal*[®]) com capacidade para 7,5 L, equipado com medidor de pH, aeração, controle de temperatura e agitação foi utilizado para os ensaios em larga escala. Para isso, 1,5 mL de suspensão de esporos de *C. echinulata* ATCC 9244 em solução de glicerol a 25 % foram transferidos para o biorreator contendo 2 litros de meio de cultura líquido de PDMS. O substrato, diluído em acetona, foi adicionado no tempo zero, junto com a adição da cepa do microrganismo no biorreator na concentração de 0,25 mg/mL. A reação ocorreu durante 96 horas, sendo mantidos os parâmetros de temperatura a 28 °C, rotação de 200 rpm, taxa de oxigênio acima de 80% e pH 6.0.

3.5.1. Filtração e extração

Após um período de 96 horas de incubação o conteúdo do biorreator foi coletado e a biomassa foi filtrada em funil de *Büchner* com gaze sob vácuo. A solução aquosa filtrada foi saturada com cloreto de sódio (Dinâmica[®]) e posteriormente filtrada em funil de *Büchner* contendo Celite-545 (Tedia[®]). O filtrado do sobrenadante da incubação foi então denominado "Fração Aquosa" e transferido para uma ampola de separação, onde foi

extraído com três porções de 100 mL de acetato de etila. Após a extração da fração aquosa com acetato de etila, a fração orgânica foi denominada acetato de etila. Então, adicionouse sulfato de magnésio anidro à esta fração e ela foi filtrada em papel de filtro. O filtrado foi então evaporado em evaporador rotativo *Tecnal*[®] modelo TE-211, acoplado a bomba de vácuo *Tecnal*[®] TE-058 resultando em um extrato bruto seco para então prosseguir para a etapa de purificação.

O micélio separado na filtração foi extraído com metanol (*Synth*[®]) (200 mL) em agitador magnético por 15 minutos e depois de filtrado em papel de filtro, denominada fração metanol. A fração foi evaporada em evaporador rotativo originando um extrato bruto seco para posterior purificação. A figura 13 mostra o fluxograma da extração.





3.5.2. Purificação do derivado

A purificação do derivado obtido da incubação com células livres em biorreator foi realizada por diferenças de solubilidade em solventes. Inicialmente, a fração acetato de etila foi lavada com hexano para retirada das impurezas apolares. Em seguida, foi adicionado acetonitrila sob banho de gelo, formando um precipitado de coloração marrom. A parte solúvel em acetonitrila foi separado do precipitado e o mesmo solubilizado em metanol ainda sob banho de gelo, onde, novamente houve formação de um precipitado de coloração marrom. O precipitado foi separado da fração solúvel em metanol (Figura 14). Análise de cromatografia em camada delgada (CCD), eluida em acetato de etila:metanol

(95:5 %), reveladas em luz UV (254 e 365 nm) verificaram a autenticidade da purificação (ARRUDA *et al.*, 2016).

Figura 14: Fluxograma de purificação do derivado obtido.



3.5.3. Identificação/caracterização do derivado

O derivado purificado foi identificado e caracterizado através de análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN ¹H ¹³C). As análises de RMN foram realizadas no Laboratório de RMN do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. O aparelho utilizado foi o espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11,75 T (500,13 MHz para ¹H e 75,46 MHz para ¹³C), equipado com sonda HR-MAS de 4 mm. Para o envio das amostras para análise, foi utilizado Metanol Deuterado (CIL – Cambridge Isotope Laboratories) com tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

 3.5.4. Cromatografia Liquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas de alta resolução (CLAE-EMAR).

A Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas foi utilizada para identificação dos metabólitos formados e realizar a cinética da reação. As amostras com

meio de cultivo foram filtradas com membrana PVDF (Polyvinylidine Fluoride, 0,45µm, 13 mm). Em algumas amostras foi adicionado metanol e em seguida homogeneizado antes da filtração. Os equipamentos utilizados foram Cromatógrafo Líquido Ultimate 3000, Thermo Scientific, com coluna ACE - C18 (4,6 x 100mm; 3µm), acoplado ao espectrômetro de Massas de Alta Resolução Q-Exactive, Thermo Scientific, com fonte H-ESI, operando em modo negativo, utilizando voltagem do spray 4 kV, gás de bainha 30, gás auxiliar 10, temperatura do capilar 350°C, temperatura de gás auxiliar 300 °C, tube lens 55 e faixa de massas m/z 150-700. A análise por CLAE foi realizada com água deonizada acidificada com 0,1 % de ácido fórmico (Fase móvel A, v/v) e metanol acidificado com 0,1% ácido fórmico (Fase móvel B – v/v). A programação gradiente realizada iniciou com 93:07 (A:B %), 70:30 (A:B %) em 10 minutos, 50:50 (A:B %) em 5 minutos, 30:70 (A:B %) em 3 minutos, 20:80 (A:B %) em 2 minutos, 100 (B %) em 3 minutos, permanecendo por 3 minutos, 93:07 (A:B %) em 2 minutos, permanecendo por 2 minutos. O tempo de corrida foi 33 minutos com fluxo de 0,3 mL/min, volume injeção 10 µL e temperatura da coluna 20 °C. Para o estudo de fragmentação foi utilizado o experimento PRM (Parallel Reaction Monitoring -Monitoramento de Reações Paralelas) com energias de colisão 30 eV (CE).

Os íons $[M - H^+]^-$ monitorados foram os de *m/z* 301,07122 (hesperetina), e *m/z* 463,12404 (hesperetina glicosídeo). Os íons selecionados não foram encontrados na amostra do branco reacional (meio PDSM na ausência de substrato).

Todas as análises de CLAE-EMAR foram realizadas no Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação – CRTI – UFG.

3.6. Avaliação de potenciais de citotoxicidade e atividade antitumoral

3.6.1. Cultivo celular

As linhagens celulares empregadas no presente estudo foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A linhagem de fibroblasto Balb/c 3T3, bem como as células de melanoma murino B16F10 foram cultivadas em meio *Dullbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), enquanto as células de adenocarcinoma alveolar de pulmão A549 foram mantidas em meio *Ham's Nutrient Mixture F12* (HAM-F12) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e as células de linfoma U937 em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Waltham, MA, EUA), penicilina (100 Ul/mL) (Gibco, Waltham, MA, EUA),

estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco, Waltham, MA, EUA) e as células foram mantidas em estufa a 37°C, atmosfera de 5% de CO₂ e umidade controlada.

Para o subcultivo das células aderentes (Balb/c 3T3, B16F10 e A549), as mesmas foram cultivadas até a obtenção de 80-90% de confluência. Em seguida, o meio de cultura foi descartado, as células eram lavadas com 10mL de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) e incubadas com 2 mL de solução de tripsina/EDTA (0,25%/0,03%). Após a desagregação, 5 mL de meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino foi adicionado aos frascos para neutralização da tripsina e as células eram coletadas e centrifugadas a 1000 RPM por 5 minutos. Para a linhagem U937, a qual era cultivada em suspensão, as células somente eram coletadas e centrifugadas nas condições acima descritas. Após a centrifugação, as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura e a contagem celular foi realizada mediante a mistura de 10 µL da suspensão celular com 10 µL do corante Azul de Tripan a 0,2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A contagem foi realizada em contador automático TC20[™] (BioRad, Hercules, CA, EUA) e as células foram utilizadas nos experimentos apenas mediante obtenção de viabilidade celular acima de 90% (OECD, 2010).

3.6.2. Preparo das substâncias-teste para os ensaios de citotoxicidade

Para a realização dos ensaios *in vitro*, tanto a Hesperetina quanto o derivado purificado Labiocon638 foram solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para a obtenção de uma solução-estoque, a qual foi mantida a -20°C. No momento de realização dos experimentos, as soluções foram diluídas em meio completo, de modo que a concentração de DMSO permanecesse inferior a 0,5% (OECD, 2010).

3.6.3. Determinação da citotoxicidade da Hesperetina e do composto Labiocon 638 sobre a linhagem Balb/c 3T3 para estimativa da DL50 in vitro.

O ensaio para a estimativa da DL₅₀ *in vitro* foi feito de acordo com o protocolo n. 129 publicado pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) (2010), o qual baseia-se na utilização de ensaios de citotoxicidade para realizar a estimativa desse parâmetro toxicológico. Para tal, as células Balb/c 3T3foram cultivadas em placas de 96 poços (3x10³ células/poço) por 24 horas para adesão e, em seguida, foram expostas a concentrações decrescentes dos compostos Hesperetina e Labiocon638 (800 – 6,25µM) por 48 horas. Após a exposição, as células foram lavadas com 250µL/poço de PBS e incubadas com meio DMEM suplementado com 5% de SFB e 25µg/mL do corante vermelho neutro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), por 3 horas em estufa de cultivo celular. Após

a incubação, as células foram novamente lavadas com 250µL/poço de PBS e, em seguida, foram adicionados 100µL/poço de solução reveladora, composta por 50% de etanol, 49% de água destilada e 1% de ácido acético glacial. As placas permaneceram sob agitação de 30 RPM por 20 minutos e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro leitor de placas (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), no comprimento de onda de 540nm. A viabilidade celular correspondente a cada concentração testada foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$(Absorbância correspondentea cada concentração - Branco correspondenteViabilidade celular (%) =
$$\frac{a cada concentração)}{(Média da absorbância do controle negativo - Branco corespondente ao controle negativo)} \times 100$$$$

Após a determinação da CI₅₀ (Concentração Inibitória do crescimento celular em 50%) para cada substância avaliada, a dose letal mediana (DL₅₀) foi estimada a partir da equação proposta no guia número 129 (OECD, 2010).

 $\log LD50 \text{ (mg/kg)} = 0.372 \log IC50 (\mu g/mL) + 2.024 (ICCVAM, 2006)$

3.6.4. Avaliação da atividade citotóxica da Hesperetina e do Labiocon638 sobre células tumorais B16F10, A549 e U937 por meio do método redução do sal de tetrazólio

Para avaliação do potencial antitumoral da Hesperetina e do composto Labiocon638, foram utilizadas linhagens celulares representantes de diferentes tipos de neoplasias: B16F10 (melanoma), A549 (adenocarcinoma de pulmão) e U937 (leucemia), os quais foram avaliados utilizando-se o método de redução do sal [brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT). Para tal, as linhagens aderentes B16F10 e A549 foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de $1x10^4$ e $5x10^3$ células/poço, respectivamente, por 24 horas para adesão. A linhagem U937, por sua vez, foi cultivada em placa de 96 poços de fundo redondo na densidade de $5x10^4$ células/poço. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações decrescentes de Hesperetina e do composto Labiocon638 (800 – 6,25µM) por 48 horas. Após o tratamento, as células foram incubadas com meio de cultura acrescido de MTT a 0,5mg/mL em estufa de cultivo, a 37°C por três horas. Posteriormente, o meio de cultura presente nas placas foi descartado e os cristais

de formazan formados foram solubilizados em 100µL/poço de DMSO, sob agitação de 30 RPM por 20 minutos. Por fim, a absorbância do conteúdo dos poços foi determinada em espectrofotômetro leitor de placas (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), no comprimento de onda de 560nm. A viabilidade celular foi calculada em relação ao controle negativo (OECD, 2010), de acordo com a equação abaixo:

(Absorbância correspondente a cada concentração – Branco correspondente *a cada concentração*) Viabilidade celular (%) = $\frac{a cada concentração}{(Média da absorbância do controle negativo - Branco corespondente ao controle negativo)} × 100$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Hesperetina – Caracterização

A flavanona hesperetina foi caracterizada por espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (CLAE-EMAR) e RMN previamente aos experimentos de incubação com o microrganismo, a fim de se confirmar sua estrutura molecular.

Para análise CLAE-EMAR foi preparada uma solução do padrão de hesperetina, conforme o item 3.1, a uma concentração de 50ppm. Encontrou-se o íon molecular 301.07184 *m/z*, com fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_6$ referente à massa da hesperetina subtraída de um próton (M-H)⁺ (Figura 17) no tempo de retenção (TR) de 28.02 min (Figura 15 e 16), com erro menor que 5.0 e uma área de 23394038439.

Tabela 2: Perfil cromatográfico da hesperetina na análise de CLAE-EMAR.

Composto	Tr (min)	Massa [M – H⁺]⁻	Fórmula Molecular	Área	Estrutura química
Hesperetina	28,22	301,07122	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	23394038439	

Figura 15: Cromatograma acoplado ao íon de m/z 301.07184 mostrando a hesperetina no tempo de retenção de 28.21.



Figura 16: Ampliação do cromatograma da figura 15, mostrando o valor de área de 23.394.038.439 para uma concentração de 50 p.p.m. de hesperetina.







Os espectros de RMN foram obtidos de acordo com o item 3.5. As atribuições e deslocamentos químicos obtidos dos espectros de ¹H ¹³C RMN da hesperetina estão na tabela 3.

	Hesperetina			
Posição	$^{1}\text{H}\delta$ (multiplicidade,			
	J = Hz)	¹³ C δ		
2	5.31 dd (12.8, 3.0)	79,0		
3ax	2,71 dd (3.0, 17.1)	43,0		
3eq	3,05 dd (12.8, 17.1)	43,0		
4	-	196,2		
5	-	162,7		
6	5.88 d (2.1)	94,7		
7	-	164,9		
8	5.90 d (2.1)	96,2		
9	-	162,7		
10	-	102,0		
1'	-	131,2		
2'	6,95 d (1,8)	113,8		
3'	-	147,3		
4'	-	149,1		
5'	6,93 d (8.2)	111,3		
6'	6,90 dd (2.14, 8.2)	118,6		
4'-OMe	3.86 s	55,4		

Tabela 3: Sinais evidenciados no espectro de RMN 1H e 13C da hesperetina

4.2. Microrganismo

A morfologia da cepa utilizada foi verificada em todas as etapas do experimento. Elas apresentaram crescimento satisfatório após o período de incubação de sete dias em meio de cultura sólido de ágar batata inclinado, onde foi possível observar aspecto macromorfológico da colônia aspecto algodonoso, inicialmente brancas e tornando-se cinzas com o tempo. Os esporos da cepa selecionada foram então ressuspendidos em uma solução de glicerol a 25% e inoculados no meio de cultura líquido de PDSM. Durante essa

incubação, foi observado o crescimento das cepas nos *erlenmeyeres*, verificando a formação de *pellets* de biomassa agregada.

Além disso, presença do halo de crescimento também foi observada durante toda a incubação indicando que a viabilidade dos micro-organismos foi mantida mesmo após a adição do substrato.

Figura 18: Cepa de *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 utilizada nos estudos de biotransformação do substrato hesperetina. (1) Antes do repique (2) Após o repique.



Fonte: Autor

4.3. Ensaio em escala semi-preparativa

Durante o ensaio em escala semi-preparativa realizado em *Erlermeyers* foi possível visualizar a presença do halo de crescimento durante toda a incubação, o que permite constatar viabilidade celular. No meio de cultura líquido de PDMS, a 28 °C e rotação de 200 rpm, o micélio apresentou-se em forma de 'pellets' (Figura 19).

Figura 19: Característica de crescimento da cepa de *C. echinulata* ATCC 9244 em meio sólido (A) e em meio líquido de PDMS (B). Em (C) verifica-se o branco reacional, meio de cultura sem adição do microrganismo.



4.3.1. Identificação dos derivados

A identificação dos derivados foi feita por Cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de Massas como descrito no item 3.5.3. Ao final do período de 96 horas, uma alíquota foi enviada para análise de CLAE-EMAR, onde se buscou os seguintes produtos descritos na tabela 4.

Os valores de área expressos na tabela 4 foram utilizados para plotar o gráfico que mostra a quantidade de produto encontrado ao final do processo (Gráfico 1). Através desses valores foi calculado o rendimento da biossíntese do derivado glicosilado nesta escala, resultando em um valor de 0,8%.

Composto	Tr (min)	Massa calculada [M – H ^{+]⁻}	Fórmula Molecular	Área	Estrutura química
Hesperetina	28,24	301,07122	$C_{16}H_{14}O_6$	5691732895	
Hesperetina Glicosídeo	26,35	463,12404	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₁	46312404	HAD OH

Tabela 4: Lista dos compostos pesquisados na análise de CLAE-EMAR ao final do bioprocesso em escala semi-preparativa.

Gráfico 1: Quantidade de hesperetina e hesperetina glicosídeo ao final do tempo de 96 horas em escala semi-preparativa. Valores expressos em função da área do pico quantificada no CLAE-EMAR.



4.4. Escalonamento da reação

Para realizar a biossíntese em maior escala, foi utilizado um biorreator de tanque agitado (Figura 20). Os principais parâmetros foram controlados automaticamente pelo software do equipamento: como temperatura (28 °C), agitação (200 r.p.m.), vazão de oxigênio constante (acima de 80%) e pH (6,0). Os parâmetros avaliados propiciaram condições satisfatórias de reação, podendo o substrato ser biotransformado em maior quantidade.

Figura 20: Biorreator de tanque agitado utilizado no escalonamento da reação



Legenda: Biorreator de Tanque agitado Tecnal®. Fonte: site Tecnal®.

No experimento delineado em biorreator de tanque agitado, o crescimento da cepa de *C. echinulata* ATCC 9244 permaneceu como o visualizado na incubação com células livres nos Erlenmeyers, micélio disperso e forma de "pellets". Também foi possível observar a formação e permanência do halo de crescimento, indicando a viabilidade da cepa durante toda a incubação (Figura 21).

Figura 21: Escalonamento da reação de biossíntese utilizando meio de cultura líquido de PDSM e *C. echinulata* ATCC 9244 como catalisadores. (A) e (B) aspecto macromorfológico da cepa em forma de 'pellets'. (C) Bioprocesso ocorrendo no biorreator.



4.4.1. Quantificação dos produtos formados e cinética reacional

Foram retiradas alíquotas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas para análise de CLAE-EMAR. Os cromatogramas estão expressos na figura 22 e os respectivos valores de área do produto procurado (hesperetina glicosídeo) estão descritos na tabela 5. Esses valores foram utilizados para a determinação da cinética reacional (gráfico 2).

Figura 22: Cromatogramas dos tempos 24h, 48h, 72h e 96h da incubação da hesperetina em biorreator. Os valores de área do pico correspondente ao íon de m/z 463,12 em modo negativo correspondente a hesperetina glicosídeo foram utilizados para a determinação da cinética reacional.



Tabela 5: Valores de área para o derivado hesperetina glicosídeo nas análises de CLAE-EMAR das alíquotas de 0h, 24h, 48h, 72h e 96h.

	Hesperetina Glicosídeo			
	(Área)			
0h	0			
24h	9990664			
48h	1809248618			
72h	4785032330			
96h	3013184296			

Gráfico 2: Cinética reacional da biossíntese do derivado hesperetina glicosídeo. Valores de área em função do tempo determinado por CLAE-EMAR.



Como observado na tabela 5, o tempo de 72 horas foi o que apresentou maior concentração do metabólito procurado, expresso em valor de área do pico cromatográfico. Houve um decréscimo do valor no tempo de 96 horas. Esta cinética reacional indica que o tempo ideal para a biossíntese de hesperetina glicosídeo seja de 72 horas.

Na análise de CLAE-EMAR da fração extraída com acetato de etila, encontrou-se o íon molecular 463,12500 *m/z* (Figura 23), com fórmula molecular $C_{22}H_{24}O_{11}$ correspondendo ao derivado hesperetina glicosídeo desprotonado (M-H)⁻, no tempo de retenção (TR) de 25,73 min, com erro menor que 5,0 ppm.



Figura 23: CLAE-EMAR do derivado glicosídeo da hesperetina da fração de extração com acetato de etila. Área utilizada para cálculo de rendimento.

O íon de m/z 301,07181 corresponde à clivagem da porção glicosídica e é característico da fragmentação na molécula de partida, hesperetina, já descritos em estudos anteriores (BRITO *et al.*, 2014). A área determinada foi utilizada para cálculo de rendimento, que foi de 22,9%.

Figura 24: Espectro de Massa em modo negativo mostrando a hesperetina glicosídeo com m/z de 463,12500 e a fragmentação na molécula da hesperetina m/z 301,07181



4.4.2. Extração

Após o período de 96 horas de incubação da hesperetina com a cepa de *C. echinulata* ATCC 9244 em biorreator, a fração aquosa do meio foi saturada com cloreto de sódio, em seguida filtrada em celite-545 à vácuo e extraída três vezes em funil de separação com acetato de etila. O extrato bruto obtido, denominado fração acetato de etila, foi seco com sulfato de sódio, filtrado em papel de filtro e concentrado em evaporador rotativo, dando origem a 760 mg.

4.4.3. Purificação do derivado obtido

O derivado obtido após processo foi submetido ao processo de purificação conforme descrito no item 3.5.2, dando origem a um pó de coloração marrom como mostra a figura 25. Posteriormente esse derivado foi enviado para caracterização por RMN.

Figura 25: Aspecto do composto após ser submetido ao processo de purificação.



O monitoramento foi realizado através de Cromatografia em Camada Delgada, onde foi utilizada a fase móvel AcOEt:MeOH (95:5) como eluente e luz UV (254 nm) para revelação. O composto purificado apresentou um Rf de 0,46, enquanto o composto de partida – hesperetina – apresentou um Rf de 0,84 (figura 26).

Figura 26: Análise por cromatografia em camada delgada do produto hesperetina **(1)** e produto purificado **(2)**. Fase móvel de AcOEt:MeOH 95:5.



4.4.4. Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear - RMN

O derivado foi purificado de acordo com o descrito no tópico 3.5.2 e os espectros de RMN de ¹H adquiridos em espectrômetro Bruker Avance III 500 (11,75 T) registrados com Metanol Deuterado (CIL – Cambridge Isotope Laboratories) com tetrametilsilano (TMS)

como padrão interno. As atribuições e deslocamentos químicos dos átomos de carbono foram obtidos através de análises 2D HSQC e HMBC. Tais resultados estão na tabela 6, juntamente com os dados de ¹H.

O derivado purificado apresentou uma unidade adicional de glicose caracterizada por sinais típicos de ¹H RMN em δ 4,99 (1H, d, J = 7,3Hz) e multipleto na região δ 3,30-3,82, respectivamente referindo-se à região anomérica (C-1) e aos hidrogênios carbinólicos. O espectro de ¹³C RMN mostrou um desvio químico para o carbono anomérico em δ 100,4. A configuração β da glicose foi confirmada através da sua constante de acoplamento (J = 7,3 Hz), como sendo o grupamento hidroxila da posição 7 da hesperetina de acordo com a correlação de HMBC entre o sinal do próton em δ 4,99 (H-1") e a ressonância de carbono em δ 164,8 (C-7). Os resultados obtidos foram comparados aos dados de Shimoda e colaboradores (2010) e confirmam a proposta apresentada. Assim, a estrutura foi determinada como sendo hesperetina 7-O- β -D-glicopiranosídeo (Figura 27).

Figura 27: Esquema da glicosilação regiosseletiva da hesperetina por *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244 na posição 7.



O microrganismo *Cunninghamella echinulata* já foi descrito como capaz de realizar reações de glicosilação de uma vasta gama de compostos em estudos anteriores realizados neste mesmo laboratório, como exemplo da glicosilação do entacapone, produzindo seu derivado β-glicosilado (LUSTOSA *et al.*, 2012) e a β-glicosilação do 4 nerolidilcatecol (CORDEIRO *et al.*, 2013).

Em estudos de biorreator, Arruda (2016) obteve a glicosilação de azidotimidina utilizando *Cunninghamella echinulata* ATCC 9245 como catalisadores e Souza (2016) realizou a N-glicosilação de um novo inibidor da fosfodiesterase, também catalisada pelo mesmo microrganismo em questão.

	Hesperetina		Hesperetina glicosídeo		
Posição	$^{1}\text{H}\delta$	¹³ C δ	$^{1}\text{H}\delta$		
	(multiplicidade, $J = Hz$)		(multiplicidade,J = Hz)	¹³ C δ	
2	5.31 dd (12.8, 3.0)	79,0	5.37 dd (6.7, 12.5)	79,5	
3ax	2,71 dd (3.0, 17.1)	43,0	2.77 dd (3.3, 17,1)	43,0	
3eq	3,05 dd (12.8, 17.1)	43,0	3.13 dd (12.8, 17.1)	43,0	
4	-	196,2	-	197,0	
5	-	162,7	-	162,8	
6	5.88 d (2.1)	94,7	6,20 d (2.1)	96,0	
7	-	164,9	-	164,8	
8	5.90 d (2.1)	96,2	6,19 d (2.1)	97,2	
9	-	162,7	-	162,9	
10	-	102,0	-	103,3	
1'	-	131,2	-	131,6	
2'	6,95 d (1,8)	113,8	6,96 d (1,8)	113,8	
3'	-	147,3	-	145,6	
4'	-	149,1	-	147,4	
5'	6,93 d (8.2)	111,3	6,94 d (8.2)	111,7	
6'	6,90 dd (2.14, 8.2)	118,6	6,91 dd (2.14, 8.2)	118,4	
4'-OMe	3.86 s	55,4	3.88 s	55,3	
1"	-	-	4.99 d (7,32)	100,4	
2"-6"	-	-	3.3-3.82, m	61.0-76.1	

Tabela 6: Sinais evidenciados no espectro de RMN ¹H e ¹³C da hesperetina e seu derivado hesperetina glicosídeo.

Glicosilações de flavonoides com cepas do gênero *Cunninghamella* foram relatadas partindo dos produtos como quercetina, kaempferol, morina e kurarinona (CAO *et al.*, 2015b; SORDON; POPŁOŃSKI; HUSZCZA, 2016). Todavia, reações de glicosilação com tal microrganismo envolvendo a flavanona hesperetina ainda não haviam sido reportados.

Miyakoshi e colaboradores (2010) relataram uma eficiente O-glicosilação de 3hidroxiflavanona por *Cunninghamella echinulata*, com alto rendimento (figura 28). Neste mesmo trabalho, o kaempferol e morina também foram glicosilados, corroborando que este sistema de derivatização fúngica não é somente aplicável para prever metabolitos de mamíferos ou de plantas, como também para biossintetizar novas moléculas com potencial atividade farmacológica.

Figura 28: Glicosilação de 3-hidroxiflavanona por cultura de células de *Cunninghamella* echinulata



Fonte: MIYAKOSHI; AZAMI; KUZUYAMA, 2010

Yuan e colaboradores (2010) realizaram a glicosilação da marcaína, um isoflavonoide, com rendimento de 16% utilizando *Cunninghamella echinulata* como catalizador, obtendo um produto com potencial atividade anticâncer.

Shimoda e colaboradores (2008) realizaram a biotransformação da hesperetina em que foi possível converter a hesperetina em três compostos monoglicosideos (Figura 29) nas posições 3', 5 e 7, porém utilizando cultura de células de *Ipomoea batatas* e *Eucalyptus perriniana*.

Figura 29: Esquema de glicosilação da hesperetina por cultura de células de *Ipomoea* batatas e *Eucalyptus perriniana*



Fonte: (SHIMODA; HAMADA; HAMADA, 2008)

Lee e colaboradores (2012) realizaram a bioconversão enzimática da hesperidina (ramnosídeo) em Hesperetina-7-O-glicosídeo (Hes-7-G) e Hesperetina na forma aglicona (figura 30). Nesse estudo, a Hesperetina-7-O-glicosídeo (Hes-7-G) foi produzida pela conversão enzimática da hesperidina por naringinase de *Aspergillus sojae*, através da remoção da ramnose terminal em um tempo de 6 horas. Posteriormente, por mais um período de 6 horas, a Hes-7-G foi convertida em hesperetina aglicona. Foi então feito teste de solubilidade, atividade de inibição da maltase intestinal e inibição da HMG-CoA redutase humana.

A solubilidade de Hes-7-G foi aumentada 55 vezes em relação à hesperidina e 88 vezes em relação à hesperetina (aglicona), o que torna a Hes-7-G mais biodisponível (LEE *et al.*, 2012).

Hes-7-G foi 1,7 vezes mais eficaz que a hesperidina e 2,4 vezes mais eficaz que a hesperetina na inibição da maltase intestinal humana, mecanismo associado à atividade antidiabética (LEE *et al.*, 2012).

Hes-7-O G foi 2 vezes mais potente que a hesperedina e 4 vezes mais potente que sua aglicona na inibição da HMG-CoA redutase humana, relacionado a atividade antilipidêmica (LEE *et al.*, 2012).

Figura 30: Análise de CLAE da bioconversão enzimática da hesperidina. (A) Hesperidina (B) reação no tempo de 6 h produzindo Hes-7-G e (C) por 12 h com conversão na forma aglicona - hesperetina.



Fonte: Adaptado de Lee e colaboradores (2012).

Além disso, a Hes-7-G exibiu inibição mais efetiva sobre o crescimento de *Helicobacter pylori* do que a hesperetina, enquanto a sua eficácia foi semelhante à da hesperidina (LEE *et al.*, 2012).

Esses resultados confirmam que a Hes-7-G é mais eficaz e biodisponível que a hesperidina e hesperetina, pois melhorou a capacidade inibitória da maltase humana, da HMG-CoA redutase e aumentou propriedades de solubilidade. Assim, justifica a necessidade em obter a glicosilação regiosseletiva da hesperetina na posição 7.

Diante do exposto, é possível presumir que a incubação da hesperetina com o microrganismo *Cunninghamella echinulata* pode ser capaz de produzir um composto glicosilado com potencial atividade antimicrobiana, antidiabética e hipocolesterolêmica (LEE *et al.*, 2012)..

4.5. Avaliação de potenciais atividades farmacológicas

4.5.1. Atividade anticâncer

Foi realizado teste de atividade anticâncer para três linhagens de células: pulmão (figura 31), melanoma (figura 32) e leucemia (figura 33). Para a linhagem de pulmão, em uma concentração de 800 µM, tanto a hesperetina quanto o derivado glicosilado purificado (Labiocon 638) não foram eficazes, mantendo a viabilidade dessas células nessa concentração.

Tanto para a linhagem de melanoma quanto para a linhagem de células leucêmicas, o composto de partida (hesperetina) atingiu a morte celular na concentração de 800 μ M. O derivado glicosilado não foi eficaz para essas linhagens, mantendo 30% das células viáveis para a linhagem de melanoma e 70% viáveis para a linhagem de leucemia em uma concentração de 800 μ M. Esses dados nos revelam que o composto hesperetina 7-O- β -Dglicopiranosídeo apresentou baixa atividade anticâncer.

Em um estudo de Ahmed e colaboradores (2016), a citotoxicidade dos flavonoides contra linhagens celulares de câncer de mama diminuiu pela glicosilação em C-3. A presença da dupla ligação C2-C3 no anel C, o grupo carbonila em C-4 e a O-hidroxilação no anel B aumentam a citotoxidade de flavonoides contra células de câncer de mama.

Em um estudo de Arthur e colaboradores (2015), a alfa glicosilação de ésteres de glicerolipídeos apresentou maior atividade contra células de câncer epitelial do que o mesmo composto beta glicosilado. O fato do composto Labiocon 638 ser um derivado beta glicosilado pode sugerir a perda da atividade anticâncer.





Figura 32: Células de Melanoma – B16F10



Figura 33: Células leucêmicas – U937



Na tabela 7, pode-se ver que para as três linhagens estudadas, a IC50 do derivado glicosilado foi maior que do composto de partida. Para atividade anticâncer, é necessário que o composto seja altamente citotóxico e específico para esses tipos de células. Para um efeito satisfatório, espera-se que o IC50 seja atingindo com uma concentração baixa. Isso não foi observado neste trabalho, em que o composto de partida apresentou menor IC50 para células cancerígenas quando comparado com o derivado Labiocon 638.

Tabela 7: Valores de IC50 Células de Adenocarcinoma de Pulmão – A549; Células de Melanoma – B16F10; Células leucêmicas – U937.

Linhagem	hesperetina (µM)	Labiocon 638 (µM)
A549	342,0	782,0
B16F10	385,0	478,0
U937	325,0	>800,0

4.5.2. Citotoxidade

No teste realizado de citotoxicidade dos compostos hesperetina e hesperetina 7-Oβ-D-glicopiranosídeo (Labiocon638) sobre a linhagem de fibroblastos 3T3 (figura 34), obtida por meio do método de incorporação do vermelho neutro, a glicosilação aumentou em 9,59 vezes a IC50 do composto de partida, hesperetina (tabela 8).

Para valores de DL50 estimada, o derivado aumentou em 2,72 vezes o valor comparado com o composto de partida (tabela 8).

Esses dados nos revelam que a glicosilação da hesperetina em hesperetina 7-O-β-D-glicopiranosídeo diminuiu acentuadamente a citotoxidade do composto.

Arruda (2018) verificou que a alfa glicosilação da zidovudina diminuía a citotoxicidade sobre células de fibroblastos murinho 3T3, mas aumentava a citotoxicidade para linhagem de melanoma. Isso pode ser explicado pelo direcionamento do composto atribuído a unidade de açúcar. A condensação desse carboidrato na configuração alfa pode ter contribuído para atividade anticâncer por ter se direcionado a essas células específicas, mantendo baixa citotoxicidade para as células de fibroblastos 3T3.

Figura 34: Determinação da citotoxicidade da hesperetina e do composto Labiocon638 sobre a linhagem Balb/c 3T3 para estimativa da DL50 in vitro



Tabela 8: IC50 das substâncias hesperetina e hesperetina 7-O- β -D-glicopiranosídeo (Labiocon 638).

			DL_{50} estimada	Categoria
Substância	IC ₅₀ (μΜ)	IC ₅₀ (µg/mL)	(mg/kg)	GHS ¹
Hesperetina	62,8	19,0	316,23	Categoria 4
Labiocon 638	602,0	279,4	859,0	Categoria 4

Legenda: IC50 representa a concentração na qual uma substância exerce metade do seu efeito inibitório máximo. DL50 representa a dose letal mediana, sendo a dose necessária de uma dada substância matar 50% de uma população em teste.

GHS: Globally Harmonized System. (OECD, 2001)

A glicosilação é uma ferramenta biotecnológica capaz de realizar modificação estrutural de compostos biologicamente ativos. Além de alterar propriedades farmacocinéticas (RIVAS *et al.*, 2013), a glicosilação aumenta a sua solubilidade em água e, assim, aumenta a sua biodisponibilidade (SLÁMOVÁ; KAPEŠOVÁ; VALENTOVÁ, 2018). Os glicosídeos são muitas vezes como "pró-fármacos", diminuindo também a citotoxidade de compostos tóxicos na forma aglicona (XIAO, 2017).

4.6. Comparação entre a escala semi-preparativa e a escala preparativa

Para a escala semi-preparativa (pequena escala), o rendimento foi de 0,8%, enquanto no aumento da escala (biorreator) o rendimento foi de 22,9%. A comparação entre a

quantidade do composto de partida (hesperetina) e a quantidade de composto desejado obtido (hesperetina glicosídeo) está ilustrada no gráfico 3.

Gráfico 3: Comparação entre a pequena e grande escala na proporção, em função da unidade de área do pico obtido por CLAE-EMAR, de produção do derivado desejado, ao final de 96 horas em ambos processos.



No biorreator de tanque agitado utilizado para o aumento de escala a vazão de oxigênio constante e acima de 80% e rotação variável entre 200 e 250 rpm mostraram-se condições adequadas ao processos, para o crescimento celular e formação de *pellets*.

A deficiência na mistura do sistema em fermentadores pode resultar em outros problemas além daqueles associados com limitação de nutrientes e oxigênio, como deficiências no controle da temperatura quando o fluido de fermentação periférica é lento, mostrando a influência da velocidade de agitação sobre a morfologia do fungo (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000; IBRAHIM, 2015)

O aumento significativo do rendimento pode ser explicado pelo fato de que apesar das condições nutricionais e de temperatura serem similares, outros fatores que influenciam no rendimento do processo como agitação (oxigenação) apresentam-se diferentes entre os processos em estudo, o que pode ter contribuído para a formação e/ou redução dos produtos formados na mudança de escala (ARRUDA, 2018).

Em bioprocesso aeróbicos, o oxigênio é um substrato chave devido à sua baixa solubilidade em soluções aquosas, sendo necessário um fornecimento contínuo. A taxa de transferência de oxigênio deve ser conhecida e, se possível, prevista para obtenção de uma operação ideal de projeto e aumento de escala em biorreatores. Muitos estudos foram

realizados para aumentar a eficiência da transferência de oxigênio. A concentração de oxigênio dissolvido em uma suspensão de microrganismos aeróbicos depende da taxa de transferência de oxigênio da fase gasosa para o líquido, da taxa na qual o oxigênio é transportado para as células (onde é consumido) e da taxa de consumo de oxigênio pelo microrganismo para crescimento, manutenção e produção de seus metabólitos (GARCÍA-OCHOA; GÓMEZ, 2009).

Variações de temperatura, oxigênio dissolvido e cisalhamento de fluidos podem causar a degradação da tensão e a falha de uma linhagem de realizar satisfatoriamente durante longos períodos processos de fermentação em grande escala (HUMPHREY, 1998).

Como as fases de um bioprocesso são dinâmicas e são as consequências do funcionamento direcionado da rede de biorreatores interagindo fortemente com o microambiente da célula, a influência da variável operacional pH na reação é realmente importante e precisa de esclarecimento para desenvolver uma estratégia operacional. Neste contexto, efeitos de operações controladas de pH, oxigênio dissolvido e fonte de nutrientes afetam diretamente os perfis de subprodutos formados (ÇALIK; YILGÖR; DEMIR, 2006).

O controle automatizado dos parâmetros (temperatura de incubação, composição do meio de cultura, pH, agitação e aeração) contribui significativamente para um bom rendimento reacional (PAPAGIANNI, 2004). A alta complexidade dos tipos morfológicos e a interação direta entre morfologia e condições reacionais exigem que tais parâmetros sejam bem determinados (KRULL *et al.*, 2013). Isto pode explicar o aumento significativo dos rendimentos quando aumentada a escala, uma vez que na escala semi-preparativa esse controle não é feito em tempo integral e de forma automatizada (GARCÍA-OCHOA; GÓMEZ, 2009).

No biorreator, foi possível obter o composto desejado com maior rendimento no tempo de 72 horas quando comparado com o tempo de 96 horas. Para transposição de escala em nível industrial, esse dado traria vantagens como menor uso de reagentes, menor consumo de energia e menor poluição ambiental.

5. CONCLUSÃO

Foi possível realizar a glicosilação regiosseletiva da hesperetina utilizando um fungo filamentoso como catalisador - *Cunninghamella echinulata* ATCC 9244, em uma única etapa e em biorreator.

O composto obtido foi identificado em hesperetina 7-*O*-β-D-glicopiranosídeo com um rendimento de 22,9%, com tempo ideal para o bioprocesso de 72 horas.

Na avaliação de potenciais atividades farmacológicas de atividade anticâncer, o derivado glicosilado obtido (hesperetina 7-*O*-β-D-glicopiranosídeo) não foi promissor, com valores de IC50 maiores que o composto de partida, representando baixa citotoxicidade para células cancerígenas.

Em contrapartida, a atividade citotóxica em fibroblastos 3T3, o derivado glicosilado apresentou IC50 9,59 vezes menor que o composto de partida, hespertina. Isso mostra que a glicosilação foi uma excelente ferramenta biotecnológica para diminuir a citotoxidade do produto em questão.

A cromatografia Líquida de alta eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas de alta resolução (CLAE-EMAR) permitiu a rápida identificação e caracterização do derivado, certificando que esta técnica se mostra bastante eficiente para monitoramento e identificação dos produtos desejados para esta análise.

Foi o primeiro trabalho realizando a biossíntese desse composto catalisado por essa espécie fúngica e em biorreator.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A. *et al.* Ligand based dendritic systems for tumor targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 350, n. 1–2, p. 3–13, 2007.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, v. 18, n. 1, p. 75–81, 2002.

AHMED, H. *et al.* Flavonoids of Calligonum polygonoides and their cytotoxicity. *Pharmaceutical Biology*, v. 54, n. 10, p. 2119–2126, 2016.

ANTECKA, A.; BIZUKOJC, M.; LEDAKOWICZ, S. Modern morphological engineering techniques for improving productivity of filamentous fungi in submerged cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 32, n. 12, 2016.

ARAÚJO, K. C. F. *et al.* Biosynthesis and antioxidant activity of 4NRC b -glycoside. *Tetrahedron Letters*, v. 54, p. 6656–6659, 2013.

ARISTIDOU, A.; PENTTILÄ, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 11, n. 2, p. 187–198, 2000.

ARRUDA, E. L. *et al.* A single-step O-glycosylation of azidothymidine in bioreactor catalysed by filamentous fungi. *Tetrahedron Letters*, v. 57, n. 39, p. 4392–4394, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.08.050>.

ARRUDA, E. L. Aplicação de fungos filamentosos como biocatalisadores em bioprocessos para produção de derivados potencialmente bioativos. 2018.

ARTHUR, G.; SCHWEIZER, F.; OGUNSINA, M. Chapter 7. Synthetic Glycosylated Ether Glycerolipids as Anticancer Agents. p. 151–179, 2015.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. Cunninghamella - A microbial model for drug metabolism studies - A review. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 1, p. 16–29, 2009. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.005>.

BAYDOUN, E. *et al.* Microbial transformation of contraceptive drug etonogestrel into new metabolites with Cunninghamella blakesleeana and Cunninghamella echinulata. *Steroids*, v. 115, p. 56–61, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2016.08.003>.

BLUMENTHAL, R. D.; GATTI, L.; ZUNINO, F. Overview of Tumor Cell Chemoresistance Mechanisms. *Chemosensitivity*, v. 111, p. 127–148, 2005.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593>.

BREDSDORFF, L. *et al.* Absorption, conjugation and excretion of the flavanones, naringenin and hesperetin from-rhamnosidase-treated orange juice in human subjects. *British Journal of Nutrition*, v. 103, n. 11, p. 1602–1609, 2010.

BRITO, A. et al. HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of

Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile. p. 17400–17421, 2014.

ÇALIK, P.; YILGÖR, P.; DEMIR, A. S. Influence of controlled-pH and uncontrolled-pH operations on recombinant benzaldehyde lyase production by Escherichia coli. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, n. 5, p. 617–627, 2006.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. SÍNTESE DE GLICOAMINOÁCIDOS DE INTERESSE BIOLÓGICO. v. 31, n. 5, p. 1027–1033, 2008.

CAO, H. *et al.* Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 1, p. 214–223, 2015a. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.012>.

CAO, H. *et al.* Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 1, p. 214–223, 2015b.

CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: Controvérsias e perspectivas. *Quimica Nova*, v. 30, n. 2, p. 441–449, 2007.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

CHOI, E. J. *et al.* Effects of hesperetin on vessel structure formation in mouse embryonic stem (mES) cells. *Nutrition*, v. 22, n. 9, p. 947–951, 2006.

CLARKE, K. G.; CORREIA, L. D. C. Oxygen transfer in hydrocarbon-aqueous dispersions and its applicability to alkane bioprocesses: A review. *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, n. 3, p. 405–429, 2008.

CORDEIRO, K. C. F. A. *et al.* Biosynthesis and antioxidant activity of 4NRC β-glycoside. *Tetrahedron Letters*, v. 54, n. 48, p. 6656–6659, 2013.

COSTA, E. M. D. M. B. *et al.* Selection of filamentous fungi of the Beauveria genus able to metabolize quercetin like mammalian cells. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 2, p. 405–408, 2008.

COUTINHO, L. *et al.* Hesperetin-etoposide combinations induce cytotoxicity in U2OS cells: Implications on therapeutic developments for osteosarcoma. *DNA Repair*, v. 50, p. 36–42, 2017.

DESMET, T. *et al.* Enzymatic glycosylation of small molecules: Challenging substrates require tailored catalysts. *Chemistry - A European Journal*, v. 18, n. 35, p. 10786–10801, 2012.

ERLUND, I. *et al.* Plasma Kinetics and Urinary Excretion of the Flavanones Naringenin and Hesperetin in Humans after Ingestion of Orange Juice and Grapefruit Juice. *The Journal of Nutrition*, v. 131, n. 2, p. 235–241, 2001. Disponível em: https://academic.oup.com/jn/article/131/2/235/4686993>.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin , hesperetin , and naringenin . Dietary sources , bioactivities , bioavailability , and epidemiology. v. 24, p. 851–874, 2004.

FARIAS, L. D. S.; MENDEZ, A. S. L. LC/ESI-MS method applied to characterization of

flavonoids glycosides in b. forficata subsp. pruinosa. Quimica Nova, v. 37, n. 3, p. 483–486, 2014.

FERLAY, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2014.

GARCÍA-OCHOA, F.; GÓMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnology advances*, v. 27, n. 2, p. 153–76, 2009. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19041387>.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 20, n. 1, p. 17–48, 2000.

GLOSTER, T. M. Advances in understanding glycosyltransferases from a structural perspective. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 28, p. 131–141, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2014.08.012>.

GONG, Y. *et al.* Inhibitory effect of hesperetin on α-glucosidase: Molecular dynamics simulation integrating inhibition kinetics. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 101, p. 32–39, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.072>.

GUZMAN-RODRIGUEZ, M. *et al.* Using bioreactors to study the effects of drugs on the human microbiota. *Methods*, v. 149, n. February, p. 31–41, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.08.003>.

HABAUZIT, V. *et al.* Increased bioavailability of hesperetin-7-glucoside compared with hesperidin results in more efficient prevention of bone loss in adult ovariectomised rats. *British Journal of Nutrition*, v. 102, n. 7, p. 976–984, 2009.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 96, p. 67–202, 2002.

HIROMOTO, T. *et al.* Structural basis for acceptor-substrate recognition of UDP-glucose: Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase from Clitoria ternatea. *Protein Science*, v. 24, n. 3, p. 395–407, 2015.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, v. 139, n. 1, p. 1–21, 2002.

HOLLMAN, P. C. H. *et al.* The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research*, v. 31, n. 6, p. 569–573, 1999.

HUMPHREY, A. Shake flask to fermentor: What have we learned? *Biotechnology Progress*, v. 14, n. 1, p. 3–7, 1998.

HYUNG KO, J.; GYU KIM, B.; JOONG-HOON, A. Glycosylation of flavonoids with a glycosyltransferase from Bacillus cereus. *FEMS Microbiology Letters*, v. 258, n. 2, p. 263–268, 2006.

IBRAHIM, D. Effect of agitation speed on the morphology of *Aspergillus niger* HFD5A-1 hyphae and its pectinase production in submerged fermentation. *World Journal of Biological*
Chemistry, v. 6, n. 3, p. 265, 2015. Disponível em: http://www.wjgnet.com/1949-8454/full/v6/i3/265.htm.

KAMINAGA, Y. *et al.* Production of unnatural glucosides of curcumin with drastically enhanced water solubility by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *FEBS Letters*, v. 555, n. 2, p. 311–316, 2003.

KANAZE, F. I. *et al.* Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 61, n. 4, p. 472–477, 2007.

KNEKT, P. *et al.* Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 76, n. 3, p. 560–568, 2002.

KRUH, G. D. Introduction to resistance to anticancer agents. *Oncogene*, v. 22, n. 47, p. 7262–7264, 2003.

KRULL, R. *et al.* Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, v. 163, n. 2, p. 112–123, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.024>.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K.-E. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. v. 57, p. 45–125, 1997. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/BFb0102072>.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The scientific world journal*, v. 2013, p. 1–20, 2013.

LAHMER, N. *et al.* Hesperidin and hesperitin preparation and purification from *Citrus* sinensis peels. *Der Pharma Chemica*, v. 7, n. 2, p. 1–4, 2015.

LE GALL, G. *et al.* Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (Lycopersicon esculentum) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 9, p. 2438–2446, 2003.

LEE, M. S. Lc / Ms Applications in Drug Development. *Lc/Ms Applications in Drug Development*, n. July, 2002.

LEE, Y.-S. *et al.* Enzymatic bioconversion of citrus hesperidin by Aspergillus sojae naringinase: Enhanced solubility of hesperetin-7-O-glucoside with in vitro inhibition of human intestinal maltase, HMG-CoA reductase, and growth of Helicobacter pylori. *Food Chemistry*, v. 135, n. 4, p. 2253–2259, 2012.

LEE, Y. S. *et al.* Enzymatic bioconversion of citrus hesperidin by Aspergillus sojae naringinase: Enhanced solubility of hesperetin-7-O-glucoside with in vitro inhibition of human intestinal maltase, HMG-CoA reductase, and growth of Helicobacter pylori. *Food Chemistry*, v. 135, n. 4, p. 2253–2259, 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.007>.

LIM, E. K. Plant glycosyltransferases: Their potential as novel biocatalysts. *Chemistry - A European Journal*, v. 11, n. 19, p. 5486–5494, 2005.

LIU, L.; CHEN, J. Solubility of hesperetin in various solvents from (288.2 to 323.2) K. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 53, n. 7, p. 1649–1650, 2008.

LIU, T. *et al.* Scale-up of L-lactic acid production by mutant strain Rhizopus sp. MK-96-1196 from 0.003 m3 to 5 m3 in airlift bioreactors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, n. 1, p. 9–12, 2006. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172306705345>.

LIU, Z. *et al.* Microbial transformation of hederagenin by Cunninghamella echinulate, Mucor subtilissimus, and Pseudomonas oleovorans. *Journal of Asian Natural Products Research*, v. 19, n. 7, p. 712–718, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1080/10286020.2016.1232252>.

LUSTOSA, K. R. M. D. *et al.* Microbial β-glycosylation of entacapone by Cunninghamella echinulata ATCC 9245. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 113, n. 5, p. 611–613, 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.01.004>.

MA, B. *et al.* Biotransformation of metoprolol by the fungus Cunninghamella blakesleeana. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 28, n. 7, p. 1067–1074, 2007.

MIYAKOSHI, S.; AZAMI, S.; KUZUYAMA, T. Microbial glucosylation of flavonols by Cunninghamella echinulata. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 110, n. 3, p. 320–321, 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.02.015>.

MUKHOPADHYAY, B. *et al.* Streamlined synthesis of per-O-acetylated sugars, glycosyl iodides, or thioglycosides from unprotected reducing sugars. *Journal of Organic Chemistry*, v. 69, n. 22, p. 7758–7760, 2004.

NIELSEN, I. L. F. *et al.* Nutrient Physiology, Metabolism, and Nutrient-Nutrient Interactions Bioavailability Is Improved by Enzymatic Modification of the Citrus. *J Nutr*, v. 136, n. October 2005, p. 404–408, 2006.

NIESSEN, W. M. A. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. *Journal of Chromatography A*, v. 1000, n. 1–2, p. 413–436, 2003.

NIESSEN, W. M. A.; TINKE, A. P. Liquid chromatography-mass spectrometry General principles and instrumentation. [S.I: s.n.], 1995. v. 703.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Acute oral toxicity: acute toxic class method. Guideline for The Testing of Chemicals, n. 423, 2001.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. *Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. Series on Testing and Assessment*, n. 129, 2010.

PALCIC, M. M. Glycosyltransferases as biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 15, n. 2, p. 226–233, 2011. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.022>.

PANIS, C. *et al.* Critical review of cancer mortality using hospital records and potential years of life lost. *Einstein (São Paulo)*, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2018.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, v. 22, n. 3, p. 189–259, 2004.

PASTUCH-GAWOŁEK, G. et al. Small molecule glycoconjugates with anticancer activity.

European Journal of Medicinal Chemistry, v. 112, p. 130–144, 2016.

PEKALA, E.; KUBOWICZ, P.; LAZEWSKA, D. Cunninghamella as a microbiological model for metabolism of histamine H3 receptor antagonist 1-[3-(4-tert-butylphenoxy)propyl]piperidine. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 168, n. 6, p. 1584–1593, 2012.

PELLISSIER, H. Use of O-glycosylation in total synthesis. *Tetrahedron*, v. 61, n. 12, p. 2947–2993, 2005.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 2000.

RIBEIRO, M. H. Naringinases: Occurrence, characteristics, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 90, n. 6, p. 1883–1895, 2011.

RIVAS, F. *et al.* Enzymatic glycosylation of terpenoids. *Phytochemistry Reviews*, v. 12, n. 2, p. 327–339, 2013.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Metabolic regulation of fermentation processes Sergio. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 895–906, 2002.

SANGPHEAK, W. *et al.* Physical properties and biological activities of hesperetin and naringenin in complex with methylated p-cyclodextrin. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v. 11, p. 2763–2773, 2015.

SHIMODA, K.; HAMADA, H. Production of hesperetin glycosides by Xanthomonas campestris and cyclodextrin glucanotransferase and their anti-allergic activities. *Nutrients*, v. 2, n. 2, p. 171–180, 2010.

SHIMODA, K.; HAMADA, H.; HAMADA, H. Glycosylation of hesperetin by plant cell cultures. v. 69, p. 1135–1140, 2008.

SLÁMOVÁ, K.; KAPEŠOVÁ, J.; VALENTOVÁ, K. "Sweet Flavonoids": Glycosidase-Catalyzed Modifications. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 7, p. 1–19, 2018.

SO, F. V. *et al.* Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutrition and Cancer*, v. 26, n. 2, p. 167–181, 1996.

SORDON, S.; POPŁOŃSKI, J.; HUSZCZA, E. Microbial Glycosylation of Flavonoids. *Polish journal of microbiology*, v. 65, n. 2, p. 137–151, 2016.

SOUZA, P. L. M. *et al.* One step N-glycosylation by filamentous fungi biofilm in bioreactor of a new phosphodiesterase-3 inhibitor tetrazole. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 26, n. 13, p. 3177–3181, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.04.085>.

TRONINA, T. *et al.* The Influence of Glycosylation of Natural and Synthetic Prenylated Flavonoids on Binding to Human Serum Albumin and Inhibition of Cyclooxygenases COX-1 and COX-2. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 22, n. 7, p. 1–20, 2017.

VEITCH, N. C.; GRAYER, R. J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins.

Natural Product Reports, v. 28, n. 10, p. 1626–1695, 2011.

VISSER, J. *et al.* Construction of a Genetically Modi ed Wine Yeast Strain Expressing the. *Microbiology*, v. 69, n. 12, p. 7558–7562, 2003.

WANG, J. *et al.* Antioxidative effects of hesperetin against lead acetate-induced oxidative stress in rats. *Indian journal of pharmacology*, v. 45, n. 4, p. 395–8, 2013. Disponível em: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3757611&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

WANG, J. N. *et al.* Swertifrancheside, an HIV-reverse transcriptase inhibitor and the first flavone-xanthone dimer, from swertia franchetiana. *Journal of Natural Products*, v. 57, n. 2, p. 211–217, 1994.

WANG, K. *et al.* Highly regioselective glycosylation of xylosyl-containing taxanes by Enterobacter cloaceae. *Fitoterapia*, v. 84, n. 1, p. 158–162, 2013. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2012.11.006>.

WANG, P. F.; ZHENG, R. L. Inhibitions of the autoxidation of linoleic acid by flavonoids in micelles. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 63, n. 1–2, p. 37–40, 1992.

WANG, T. YANG; LI, Q.; BI, K. SHUN. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 13, n. 1, p. 12–23, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>.

WEIJERS, C. A. G. M.; FRANSSEN, M. C. R.; VISSER, G. M. Glycosyltransferasecatalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, v. 26, n. 5, p. 436–456, 2008.

XIAO, J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 57, n. 9, p. 1874–1905, 2017. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2015.1032400>.

XIAO, J.; CHEN, T.; CAO, H. Flavonoid glycosylation and biological benefits. *Biotechnology*Advances,2014.Chttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975014000925>.

XIAO, J.; MUZASHVILI, T. S.; GEORGIEV, M. I. Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids. *Biotechnology Advances*, v. 32, n. 6, p. 1145–1156, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.006>.

XU, F. *et al.* Biotransformation of patchoulol by Cunninghamella echinulata var. elegans. *Fitoterapia*, v. 109, p. 201–205, 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2016.01.001>.

YADAV, V. *et al.* α-I-Rhamnosidase: A review. *Process Biochemistry*, v. 45, n. 8, p. 1226–1235, 2010. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.05.025>.

YANG, B. *et al.* New insights on bioactivities and biosynthesis of flavonoid glycosides. *Trends in Food Science and Technology*, v. 79, n. March, p. 116–124, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.006>.

YANG, H. L. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from hesperetin-administered rat serum: An ex vivo approach. *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry, v. 60, n. 1, p. 522–532, 2012.

YUAN, W. *et al.* Glycosylation of (-)-maackiain by Beauveria bassiana and Cunninghamella echinulata var. elegans. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 28, n. 2, p. 117–121, 2010.

Anexos

7. ANEXOS

ANEXO A- Espectro integrado de ¹H RMN da hesperetina obtido em CD₃OD. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).



ANEXO B- Espectro integrado HSQC da hesperetina obtido em CD₃OD. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).



ANEXO C- Espectro integrado de ¹H RMN do derivado glicosilado obtido em CD₃OD. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).



ANEXO D - Espectro integrado de HSQC do derivado glicosilado obtido em Metanol CD₃OD. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).



ANEXO E - Espectro integrado de HMBC do derivado glicosilado obtido em CD₃OD. Espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11.75 T (500,13 MHz).



O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001